



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE INVESTIGACION TRANSLACIONAL
CRANEOFACIAL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL**

**CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL DURANTE
EL TRANCURSO DE PERIODONTITIS EXPERIMENTAL**

Lukas Felipe Restelli Jiménez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociada Loreto Abusleme Ramos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asociado Nicolás Dutzan Muñoz

Prof. Asistente Marion Arce Paniagua

**Adscrito a Proyecto FONDECYT de iniciación 11180505
Santiago - Chile
18 del Mes Octubre de 2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE INVESTIGACION TRANSLACIONAL
CRANEOFACIAL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL**

**CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL DURANTE
EL TRANCURSO DE PERIODONTITIS EXPERIMENTAL**

Lukas Felipe Restelli Jiménez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Asociada Loreto Abusleme Ramos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Asociado Nicolás Dutzan Muñoz

Prof. Asistente Marion Arce Paniagua

Adscrito a Proyecto FONDECYT de iniciación 11180505

Santiago - Chile

18 del Mes Octubre de 2022

Agradecimientos

El paso por pregrado y este trabajo de tesis no hubiesen sido posibles sin los aportes que he recibido en mi proceso formativo por parte del equipo docente y en particular gracias a la Dra. Loreto Abusleme quien me guió en el proceso de tesis.

Agradecer a las personas que conocí durante este camino y que también formaron parte de este proceso formativo, en especial a mis amigos más cercanos, con quienes compartí prácticamente todos los años de la carrera.

Lo más importante agradecer a mi familia, a mis papás por todo el esfuerzo que significa el hecho de tener un hijo estudiando en la universidad, gracias por su apoyo incondicional, su compañía, sus consejos en momentos difíciles y por sobre todo por su amor infinito.

A mis hermanos, quienes siempre han estado a mi lado, gracias por su apoyo y su amor. Por último, a cada persona que de alguna u otra manera son parte de la persona que soy hoy en día.

ÍNDICE

1) RESUMEN:	1
2) INTRODUCCIÓN:	2
3) MARCO TEÓRICO:	3
Generalidades de periodontitis	3
Microbioma y disbiosis en periodontitis	4
Aumento de la carga bacteriana total durante periodontitis	6
Modelo de periodontitis inducida por ligadura y el aumento de la carga bacteriana total	7
Planteamiento del problema	9
4) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:.....	11
5) MATERIALES Y MÉTODOS:	12
Animales y modelo de periodontitis experimental	12
• Toma de muestra microbiológica	13
• Extracción de ADN	13
• Cuantificación de la carga bacteriana total	13
• Determinación de pérdida ósea	14
• Análisis estadísticos	15
6) RESULTADOS:	16
Aumento de la carga bacteriana total durante periodontitis inducida por ligadura	16
Aumento de la pérdida ósea durante periodontitis inducida por ligadura	17
Correlación positiva entre carga bacteriana total y pérdida ósea	18
7) DISCUSIÓN:	20
8) CONCLUSIONES:	26
9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	27
7. ANEXOS.....	32

1) RESUMEN:

Introducción: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial asociada a una disbiosis del microbioma subgingival, caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Debido a lo anterior, el microbioma subgingival ha sido un blanco de estudio a lo largo del tiempo para caracterizar de mejor manera su rol en periodontitis. A raíz de esto es que han surgido diferentes modelos experimentales de periodontitis, sin embargo, el modelo de periodontitis inducido por ligadura ha demostrado ser un modelo de elección a la hora de estudiar carga bacteriana total debido a que nos permite generar una acumulación bacteriana en relación con la sutura, que produce una inflamación local y finalmente la pérdida de hueso alveolar. Además, permite recolectar muestras biológicas en distintos puntos de tiempo. A la fecha aún no existen suficientes antecedentes para establecer la dinámica del aumento de la carga bacteriana total (CBT) en la transición de salud a enfermedad. El objetivo de este trabajo fue cuantificar secuencialmente la CBT durante periodontitis inducida por ligadura y establecer su correlación con la pérdida ósea alveolar.

Metodología: En ratones de la cepa C57BL/6 se realizó el modelo de periodontitis inducido por ligadura (PIL). Se recolectó la ligadura en distintos tiempos experimentales, 2 horas, día 1, 3, 5 y 7 post-colocación de la ligadura. Se extrajo el ADN proveniente de las ligaduras usando una versión modificada de DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Posteriormente, se realizó un ensayo PCR en tiempo real, para cuantificar el gen 16S rADN utilizando un ensayo TaqMan previamente publicado. La pérdida ósea se registró de forma morfométrica en 6 sitios predeterminados. Como análisis estadístico, se determinó la distribución de los datos mediante el test de Shapiro-wilk, y se utilizó el test de Kruskal-Wallis y la correlación de Spearman.

Resultados: Se observa un aumento temprano de la carga bacteriana total, el cual es significativo a partir del día 3 y tiende a mantenerse hasta el día 7. En cuanto a la pérdida ósea se observa que esta es significativa a partir del día 5 post-ligadura. Además, determinamos que la CBT se correlaciona de forma positiva con la pérdida ósea.

Conclusiones: Se observa aumento significativo temprano de la CBT en la transición de salud a enfermedad, la cual se correlaciona de forma positiva con la pérdida ósea, lo que tiene un papel esencial en la patogénesis de la periodontitis experimental.

2) INTRODUCCIÓN:

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial, asociada a una disbiosis del microbioma subgingival, que se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Si bien es una enfermedad multifactorial se ha visto que depende en gran medida del microbioma subgingival, es por esto por lo que ha sido blanco de análisis en diversos trabajos. Distintos estudios reportan que los cambios que suceden en la composición del microbioma subgingival en la transición de salud a enfermedad son estos a los que denominamos disbiosis y se caracteriza por la expansión de uno o más taxones que normalmente se encuentran en menor proporción.

Cabe destacar que es una enfermedad que se relaciona con otras enfermedades crónicas no transmisibles como HTA, DM I y II, efectos adversos durante el embarazo entre otras, además es un problema en salud pública debido a su alta prevalencia e implicancia en la calidad de vida de quienes la padecen.

Por otro lado, tenemos estudios que reportan como varía la carga bacteriana en la transición de salud a enfermedad, es en este sentido que se introduce el modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratones, que consiste en la colocación de una sutura 5-0 de manera atraumática alrededor del segundo molar maxilar izquierdo del ratón, el cual genera acumulación bacteriana y por ende inflamación y pérdida de hueso alveolar. En este modelo se ha determinado que existe un aumento de la carga bacteriana total cultivable en la transición de salud a enfermedad y también se ha determinado este aumento mediante técnicas de biología molecular como el PCR en tiempo real, sin embargo, en ambos casos tenemos distintas limitaciones, como los tiempos experimentales, o la técnica utilizada para cuantificar la carga bacteriana.

Por lo tanto, no contamos con suficiente información sobre cómo es la dinámica del aumento de la carga bacteriana total en la transición de salud a enfermedad, usando tiempos experimentales tempranos y técnicas de biología molecular (PCR en tiempo real) para la cuantificación, a su vez determinar cómo se relaciona esta dinámica con la pérdida de hueso alveolar.

3) MARCO TEÓRICO:

Generalidades de periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, asociada con una disbiosis de las comunidades microbianas subgingivales, caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente, manifestada clínicamente como pérdida del nivel de inserción clínico, presencia de sacos periodontales y sangrado gingival, pudiendo resultar en la pérdida de los dientes afectados (Papapanou y cols., 2018).

La periodontitis es actualmente considerada la sexta enfermedad con mayor prevalencia en el mundo, alcanzando un 11,2%, lo que afecta aproximadamente 743 millones de personas (Tonetti y cols., 2017). En Chile, la periodontitis también es una enfermedad altamente prevalente, se estima que un tercio de los adultos jóvenes y dos tercios de los adultos mayores presentan alguna forma severa de esta, con pérdida de inserción clínica mayor a 6 mm utilizando la clasificación CDC/AAP (Gamonal y cols., 2010). Utilizando la clasificación AAP/EFP, la prevalencia de periodontitis en adolescentes es de un 75,6% y en adultos es de un 99%, en ambos se presenta una mayor prevalencia en comparación a los resultados obtenidos utilizando la clasificación CDC/AAP (Morales y cols., 2021).

La periodontitis representa un gran problema en salud pública, afectando la salud general y la calidad de vida de quienes la padecen (Chapple, 2014; Buset y cols., 2016). Además, se ha estudiado la relación entre periodontitis y un riesgo aumentado de padecer y modificar la patogénesis de varias enfermedades crónicas (Hou y cols 2022). Pacientes con periodontitis poseen un riesgo 25% mayor de presentar enfermedades cardiovasculares en comparación con aquellos que presentan una mínima expresión de la enfermedad (DeStefano y cols., 1993; Hou y cols., 2022). Estudios sugieren que *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), la cual es una bacteria que participa en la etiopatogénesis de la periodontitis (Hajishengallis y cols., 2011), tiene un papel en cáncer oral generando la inhibición de la apoptosis celular mediante la unión con receptores TLR4, los cuales activan la vía de señalización NF-κB, lo que a su vez sobre estimula la vía de señalización JAK1/STAT3 (Cao y cols., 2015) y estimulando la proliferación de células epiteliales (Kuboniwa cols., 2007). También se ha

relacionado con enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades respiratorias, trastornos mentales, enfermedad crónica en riñones e hígado, diabetes mellitus tipo I y II, artritis reumatoide, aterosclerosis y eventos adversos durante el embarazo (Lalla y Papapanou., 2011; Reynolds., 2014; Hou y cols., 2022).

La etiología de esta enfermedad es multifactorial, sin embargo, depende en gran medida de la microbiota que habita la zona subgingival (Socransky and Haffajee., 2005; Kornman., 2008). Diversos estudios han demostrado que se requiere de una acumulación bacteriana para que se produzcan cambios inflamatorios en el periodonto (Hernández y cols., 2011; Abusleme y cols., 2013). Es importante recalcar sobre esta enfermedad que, en un paciente susceptible, estas comunidades bacterianas inducen una respuesta inmune local desregulada que lleva a una destrucción del tejido periodontal mediada por el hospedero (Kinane y cols., 2017).

Estudios clásicos han revelado que la remoción o disminución de los microorganismos mediante el tratamiento periodontal resuelve las características clínicas inflamatorias a nivel local (Löe y cols., 1965). Esta noción fundamental ha sido posteriormente reforzada por distintos estudios en los cuales se utilizaron modelos animales y se demostró que la reducción o eliminación completa del microbioma (en ratones libres de gérmenes), se asoció con una reducción en la pérdida de hueso alveolar (Keyes y Jordan, 1964, Rovin y cols., 1966, Hajishengallis y cols., 2011). Por lo tanto, la microbiota subgingival es fundamental para la etiopatogénesis de esta enfermedad y ha sido un blanco de estudio permanente en el área de la investigación periodontal.

Microbioma y disbiosis en periodontitis

Actualmente se ha establecido que existen cambios significativos en la composición y en la estructura de la microbiota subgingival, durante la transición desde salud periodontal hacia periodontitis (Abusleme y cols., 2021), esta disrupción en la composición de la comunidad microbiana se ha denominado “Disbiosis”, caracterizada por la expansión de uno a más taxones que generalmente se encuentran en menores proporciones en el ambiente (Winter y Baumler., 2014). Estos cambios en la composición de la microbiota subgingival

probablemente son el resultado de la formación de nuevos nichos por bacterias colonizadoras que crean un ambiente propicio para el establecimiento de otras especies. Si bien existe un aumento de bacterias anaeróbicas en general, las bacterias Gram negativo son de particular interés debido a que poseen ligandos del sistema inmune innato como los lipopolisacáridos y lípidos que contienen serina, que activan una respuesta inflamatoria y probablemente su carga aumentada induce gingivitis (Darveau y cols., 2004; Clarck y cols., 2013). En gingivitis el exudado inflamatorio que se encuentra en el surco subgingival favorece el crecimiento de bacterias Gram negativo que utilizan glicoproteínas como su principal fuente de energía (Grenier y cols., 2001), perpetuando esta relación entre inflamación y cambios en la composición de la microbiota subgingival (Schatzle y cols., 2003).

Se ha visto que, tanto en gingivitis como en la destrucción de los tejidos de soporte asociados a periodontitis, se correlaciona con cambios específicos en la composición del microbioma subgingival. Se observó que entre las especies bacterianas asociadas a salud tenemos a *Rothia* sp. y *Actinomyces* sp., Por otra parte, además de las especies clásicas vinculadas con periodontitis como *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *P. gingivalis* (Socransky y cols., 1998), se ven asociadas especies como las pertenecientes a los géneros *Eubacterium*, *Parvimonas* y la especie *Filifactor alocis*. (Abusleme y cols., 2013; Abusleme y cols., 2021).

De las especies nombradas anteriormente, toma gran importancia *P. gingivalis*, al ser un patobionte clave en la patogénesis de periodontitis. En un estudio realizado en ratones a los cuales se les induce periodontitis con *P. gingivalis*, muestran evidencia de pérdida ósea, aunque *P. gingivalis* solo coloniza la cavidad oral murina en baja abundancia (Hajishengallis y cols., 2011). En este modelo se ha visto que *P. gingivalis* desregula la cascada del complemento de forma dependiente de proteasa y bloquea la fagocitosis de los neutrófilos, promoviendo el crecimiento de la microbiota y en última instancia genera una respuesta inflamatoria con la consecuente pérdida ósea. *P. gingivalis* es llamada un patógeno clave, debido al papel que tiene en favorecer y dar forma a la comunidad microbiana de manera que promueve la patogénesis de la enfermedad (Hajishengallis y cols., 2011).

Los cambios en el microbioma detectados en sitios con periodontitis son la consecuencia del

sinergismo inter-bacteriano y las perturbaciones ambientales producidas por la desregulación inmune e inflamatoria (Hajishengallis y cols., 2012; Hajishengallis y cols., 2014). Por lo tanto, aunque especies específicas inicien la respuesta destructiva de los tejidos, estas especies también dependen de otros miembros de la comunidad. De este modo la comunidad disbiótica como un todo, representa un desafío microbiano para la encía adyacente (Abusleme y cols., 2021).

Aumento de la carga bacteriana total durante periodontitis

Varios estudios han demostrado que existe un aumento en la biomasa bacteriana en sitios afectados por periodontitis (Abusleme y cols., 2013; Abe y Hajishengallis, 2013), además se ha asociado la enfermedad con una mayor diversidad bacteriana en el microbioma subgingival (Kirst y cols., 2015; Hong y cols., 2015) y se ha demostrado que la periodontitis no se inicia por el aumento de una especie bacteriana en particular, sino más bien, sucede cuando existe disbiosis de toda la comunidad microbiana (Griffen y cols., 2012; Abusleme y cols., 2013). Con respecto a las variaciones en la carga bacteriana durante periodontitis, si bien sabemos que existe un aumento durante periodontitis, no existen muchos antecedentes respecto a cómo se comporta en la transición desde salud, gingivitis y periodontitis. Se ha demostrado un aumento de la carga bacteriana total en un modelo de gingivitis experimental en pacientes, de los cuales se tomaron muestras microbiológicas en los días 0, 7, 14, 21 después de la abstención de higiene y luego al día 42 habiendo retomado las medidas de higiene oral. Se aprecia que existe un aumento paulatino de la carga bacteriana, detectándose la mayor carga bacteriana total al día 21, disminuyendo hacia el día 42 (Schincaglia y cols., 2016). Sin embargo, al ser este un estudio en gingivitis experimental se desconoce que sucede con la carga bacteriana total en etapas posteriores cuando eventualmente algunos individuos susceptibles comenzarían a experimentar periodontitis y, por consiguiente, pérdida ósea alveolar.

Encontramos estudios que nos hablan del aumento de la carga bacteriana total en modelos experimentales de ratón en los cuales se induce periodontitis a través de la inoculación de *P. gingivalis* y se evalúan después de 6 meses, en estos se demuestra que *P. gingivalis* induce

un cambio en la cantidad y composición del microbioma subgingival cultivable. A su vez, se observa que *P. gingivalis*, incide en la pérdida de hueso alveolar (Hajishengallis y cols., 2011). Sin embargo, tiene la limitación de ser un estudio que evalúa solo el aumento de la carga bacteriana total cultivable.

Modelo de periodontitis inducida por ligadura y el aumento de la carga bacteriana total

Para poder investigar sobre los cambios que existen en la transición desde salud a enfermedad, es necesario contar con un modelo experimental que permita analizar los distintos factores que influyen en dicha transición. En ese contexto, el modelo de periodontitis inducida por ligadura (PIL) aparece como una excelente herramienta. Este consiste en ubicar una sutura de seda 5-0, alrededor del segundo molar maxilar, lo que lleva a una acumulación local de la biopelícula bacteriana, inflamación gingival, seguida por pérdida de las estructuras de soporte del diente, incluyendo el hueso alveolar (Abe y Hajishengallis, 2013). Por otra parte, se ha descrito que en el modelo PIL, se produce un aumento en la microbiota total cultivable, sin embargo, solo se realizan cultivos para bacterias anaeróbicas y se describe que existe una gran dificultad en la técnica para determinar de manera cuantitativa una muestra de microbiota periodontal (Hajishengallis y cols., 2011; Abe y Hajishengallis, 2013), no obstante este es un modelo experimental apropiado para estudiar la evolución de la carga bacteriana total conforme se genera la destrucción periodontal. Es en este sentido en que se estudió el aumento de la carga bacteriana total cultivable durante periodontitis experimental, aplicando el modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratones, en el cual se mide carga bacteriana total en los días 1, 3, 5 y 8 post colocación de la ligadura y se obtiene un aumento de la carga bacteriana total cultivable significativo al día 5 (Abe y Hajishengallis, 2013). Sin embargo, sólo se pudo determinar la carga bacteriana total a través de cultivos anaeróbicos y conteo de unidades formadoras de colonias.

Por otra parte, el aumento en la carga bacteriana total observado durante el modelo PIL se puede inhibir con la administración de antibióticos, por consecuencia también se detiene la pérdida de hueso alveolar (Dutzan y cols., 2018). Esto refleja la dependencia de la acumulación de carga bacteriana a nivel de los tejidos periodontales y su papel fundamental

en la pérdida ósea alveolar.

Se ha demostrado también, un aumento de la carga bacteriana total, utilizando técnicas de biología molecular más precisas como lo es el PCR en tiempo real, que permiten estimar de mejor manera la biomasa de estas comunidades, ya que dan la posibilidad de cuantificar la totalidad de las bacterias y no solo aquellas que pudieron crecer en determinadas condiciones. Se observó que al comparar ratones control y ratones que carecían de células Th17, a los cuales se les había aplicado el modelo PIL y se recolecta la muestra 10 días después, se encuentra una mayor carga bacteriana total en el grupo intervenido, sin embargo, no se proporcionan antecedentes sobre cómo es la dinámica de la carga bacteriana total en la transición desde salud a enfermedad (Tsukasaki y cols., 2018).

Por todo lo anterior es que se necesitan estudios que evalúen la evolución de la carga bacteriana total, lo cual es muy relevante a la hora de entender como este factor influye en el desarrollo de la periodontitis. Si bien sabemos que en periodontitis existe una disbiosis del microbioma subgingival y que es necesario un aumento en la biomasa para producir daño en los tejidos de soporte del diente, desde un punto de vista ecológico, es necesario caracterizar la dinámica de esta acumulación bacteriana y cómo se correlaciona con la pérdida de hueso alveolar. Existe información a la fecha sobre el aumento de la carga bacteriana total en periodontitis, sin embargo, de nuestro conocimiento, no hemos encontrado estudios que realicen la cuantificación de esta carga bacteriana total mediante técnicas de biología molecular más precisas (como PCR en tiempo real), en tiempos experimentales tempranos, analizando como es la dinámica de este aumento en la transición desde salud a periodontitis y realizando su correlación con la pérdida ósea.

Planteamiento del problema

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, crónica, no transmisible, multifactorial, asociada a una disbiosis del microbioma subgingival y que tiene como característica principal, la destrucción de los tejidos de soporte del diente (Papapanou y cols., 2018).

Se considera un problema en salud pública debido a que es una enfermedad altamente prevalente tanto a nivel mundial (Tonetti y cols., 2017), como en Chile (Gamonal y cols., 2010), afectando la salud general y la calidad de vida de quienes la padecen (Chapple, 2014; Buset y cols., 2016). Además de estar relacionada con otras enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo I y II y eventos adversos durante el embarazo entre otras. (Lalla y Papapanou., 2011; Reynolds., 2014; Hou y cols., 2022).

Si bien la etiología de la periodontitis es multifactorial, depende en gran medida de la microbiota subgingival (Socransky and Haffajee., 2005; Kornman., 2008), por lo que es de gran importancia conocer cómo evoluciona el microbioma subgingival en la transición de salud a enfermedad.

En este aspecto es que surgen diferentes estudios que describen los cambios que se producen en la composición del microbioma subgingival en la transición de salud a enfermedad (Abusleme y cols., 2021) y otros estudios que describen como varía la carga bacteriana total en esta transición (Hajishengallis y cols., 2011; Abusleme y cols., 2013; Abe y Hajishengallis., 2013 Schincaglia y cols., 2016).

En este sentido es que se introduce el modelo de periodontitis inducida por ligadura, que consiste en la colocación de una sutura 5- 0 alrededor del primer molar maxilar izquierdo en ratones, lo que va a generar una acumulación bacteriana y por consiguiente inflamación y pérdida de hueso alveolar.

Sin embargo, a la fecha no contamos con información precisa respecto a cómo es la dinámica de este aumento en la carga bacteriana total durante la transición de salud a periodontitis, debido al uso de tiempos experimentales tardíos o a la cuantificación restringida sólo a las especies bacterianas que crecen en determinadas condiciones (cultivos anaeróbicos).

Es por esto por lo que, para un mejor entendimiento de la dinámica de la carga bacteriana total, necesitamos la utilización de técnicas de biología molecular y tiempos experimentales tempranos que nos permita obtener datos desde el inicio (salud) hasta el desarrollo de periodontitis experimental, además de poder correlacionar estadísticamente la incidencia que tiene la carga bacteriana total en la pérdida ósea.

4) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

HIPÓTESIS.

Existe un aumento temprano y sostenido en la carga bacteriana total durante periodontitis inducida por ligadura, que tiene una correlación positiva con la pérdida de hueso alveolar.

OBJETIVO GENERAL.

Cuantificar secuencialmente la carga bacteriana total durante la inducción de periodontitis experimental y establecer su correlación con la pérdida ósea alveolar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Cuantificar de manera secuencial la carga bacteriana total durante la inducción de periodontitis experimental.
- 2) Correlacionar la carga bacteriana total con la pérdida ósea alveolar durante la inducción de periodontitis experimental.

5) MATERIALES Y MÉTODOS:

El desarrollo del presente trabajo se enmarca dentro del Proyecto FONDECYT 11180505 (Anexo 1)

Animales y modelo de periodontitis experimental: Se utilizaron ratones libres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free, SPF) C57BL/6, estos son animales sin cambios puntuales en su microbiota por lo que pueden ser usados como modelo de enfermedades humanas, los animales se utilizaron entre las 10 a 15 semanas de edad. Los animales fueron alojados en “Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile”. Los siguientes procedimientos cuentan con la aprobación del “Comité de Bioética en Animales de Experimentación” (CICUA) de la Facultad de Odontología, U. de Chile (Anexo 2). En dichos animales, se realizó el modelo de periodontitis inducida por ligadura, el cual consiste en la colocación de una sutura 5-0 alrededor del segundo molar maxilar izquierdo, bajo anestesia con ketamina/xilacina como se ha descrito previamente (Abe y Hajishengallis, 2013). El molar contralateral no fue intervenido y fue usado como control para determinar las medidas de pérdida de hueso alveolar. En el modelo PIL, la ubicación de la sutura gatilla el acumulo de bacterias comensales en el periodonto lo que desregula la respuesta inmune, generando la pérdida del hueso alveolar.

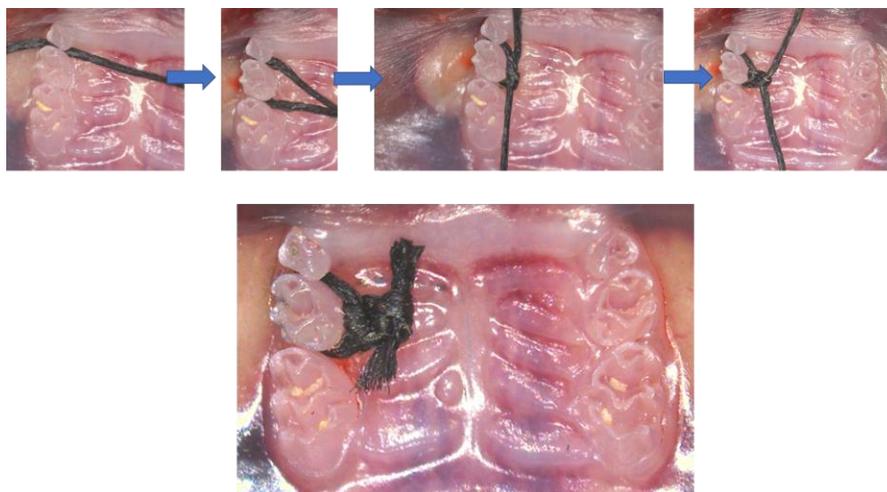


Figura 1. Modelo de periodontitis inducida por ligadura: Consiste en la ubicación atraumática de una seda 5-0 en el segundo molar maxilar, lo que lleva a una acumulación bacteriana local, produciendo inflamación gingival y posteriormente a pérdida de hueso alveolar (Dutzan y cols., 2018).

- **Toma de muestra microbiológica:** Para poder caracterizar el aumento de la carga bacteriana en un modelo experimental de periodontitis, los animales fueron sacrificados en diferentes puntos de tiempo para la toma de muestras, incluido el tiempo basal (2 horas post-colocación de la ligadura) y luego los días 1, 3, 5 y 7 después de la colocación de la ligadura. En los días indicados se recolectó la sutura para cuantificar molecularmente la carga bacteriana, la cual fue depositada en 150 µl de buffer TE y almacenada a -80 °C para análisis posteriores. Adicionalmente, el cráneo del ratón fue conservado y los tejidos blandos eliminados para medir la pérdida de hueso alveolar como se describe más adelante. Los datos de pérdida de hueso alveolar fueron obtenidos de otro trabajo de investigación recientemente finalizado y corresponde a la tesis de la estudiante Srta. Catalina Moreno.
- **Extracción de ADN:** El ADN bacteriano fue extraído de las muestras de sutura, usando una versión modificada de DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen), que incluye un paso de lisis química/enzimática como se ha descrito previamente (Abusleme y cols., 2014). Este método consiste en agregar una etapa previa de lisis en la cual las muestras se mezclan con lisozima, son incubadas por 30 minutos y luego se agrega buffer AL (Proveniente del kit Dneasy Blood and Tissue, Qiagen) y proteinasa K, las muestras se incuban a 56° C por la noche. Al día siguiente se vuelven a incubar, pero esta vez a 95° C y luego se siguen los pasos del kit Dneasy Blood and Tissue como indica el fabricante. Esto nos permite una mejor recuperación de especies bacterianas y facilita la comparación de los datos. La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo estimando su concentración en ng/ul medido con un espectrofotómetro (NanoDrop ND1000) a 260 nm de longitud de onda. El ADN extraído fue almacenado a -80 °C hasta su utilización en el ensayo de carga bacteriana total.
- **Cuantificación de la carga bacteriana total:** La determinación de la carga bacteriana total se realizó utilizando un ensayo de PCR en tiempo real, realizando la cuantificación absoluta de los genes 16S ADN ribosomal, que es un gen conservado

presente en todas las bacterias, como se ha descrito anteriormente (Moutsopoulos y cols., 2015). Brevemente, la biomasa total fue cuantificada basada en curvas estándar de ADN genómico diluido de una especie bacteriana conocida (*Fusobacterium nucleatum*), con en el rango de 10^2 a 10^8 moléculas del gen 16S ADN ribosomal. La reacción fue realizada en triplicado usando el TaqMan Gene Expression Master Mix, primers y sondas TaqMan personalizadas que corresponden a el primer directo 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' (T_m , 59 ± 4 °C), el primer inverso, 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' (T_m , 58 ± 1 °C) y la sonda (6-FAM)-5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC3'-(TAMRA), para un sistema PCR en tiempo real StepOnePlus de acuerdo con las indicaciones del fabricante (LifeTechnologies).

- Determinación de pérdida ósea: El cráneo de los ratones fue congelado y conservado, se lavaron e hirvieron para luego retirar cuidadosamente los tejidos blandos con hoja de bisturí y posteriormente con pinza bajo lupa estereoscópica, las muestras fueron sumergidas en peróxido de hidrogeno al 3% durante 24 horas. Posteriormente fueron lavadas y teñidas con azul de metileno al 1%, se realizó el registro fotográfico con lupa estereoscópica (Stemi 508) y cámara (AxioCam 208 color), en programa ZEN 3.2 (blue edition). Para determinar la pérdida de hueso alveolar se utilizó el programa Fiji y se midió la distancia entre el límite amelocementario (LAC) y la cresta ósea alveolar (COA), estandarizado en milímetros, en 6 áreas predeterminadas, surco distal del primer molar (SD1M), cúspide distal del primer molar (CD1M), cúspide mesial del segundo molar (CM2M), surco palatino del segundo molar (SP2M), cúspide distal del segundo molar (CD2M) y cúspide palatina del tercer molar (CP3M), como se ha descrito previamente (Abe y Hajishengallis., 2013). Para la determinación de la pérdida ósea se utilizó la medida en milímetros de la distancia entre LAC y COA del grupo ligado y se resta la distancia LAC – COA del grupo no ligado.

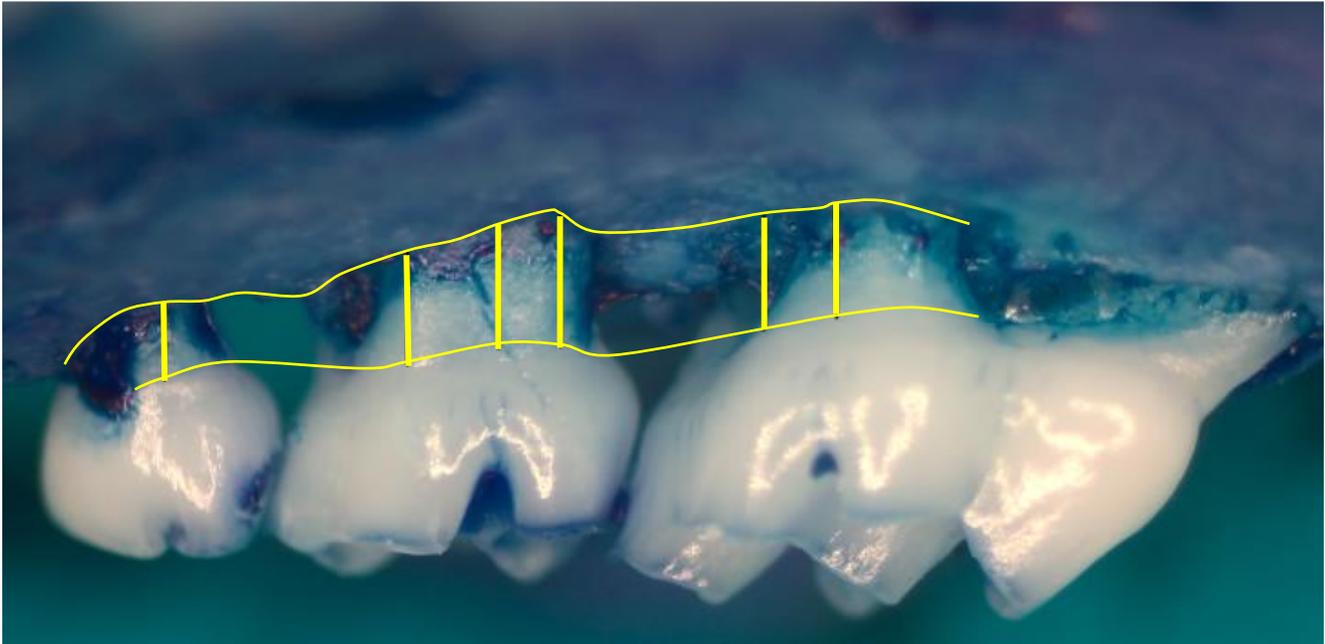


Figura 2. Determinación de pérdida ósea: Imagen corresponde a registro fotográfico obtenido con lupa estereoscópica (Stemi 508) y cámara (Axiocam 208 color) en programa ZEN 3.2 (Blue edition). La imagen fue procesada en programa Fiji para estandarizar las medidas en milímetros. Las siglas corresponden a: CP3M (Cúspide palatina 3^{er} molar), CD2M (Cúspide distal 2^{do} molar), SP2M (Surco palatino 2^{do} molar), CM2M (Cúspide mesial 2^{do} molar) y CD1M (Cúspide distal 1^{er} molar), SD1M (Surco distal 1^{er} molar).

- Análisis estadísticos: Se evaluó la distribución de los datos de carga bacteriana total y pérdida ósea con el test de Shapiro-Wilk, arrojando como resultado una distribución no paramétrica, por lo que se evaluó la diferencia entre grupos con el test de Kruskal-Wallis, y para los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Para dichos análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism 9.

6) RESULTADOS:

Aumento de la carga bacteriana total durante periodontitis inducida por ligadura.

Se ha demostrado que, en la transición de salud a periodontitis, en humanos y modelos animales, existe un aumento de la carga bacteriana total (Hajishengallis y cols., 2011; Abusleme y cols., 2013; T. Abe y G. Hajishengallis, 2013 Schincaglia y cols., 2016). Para medir este aumento de forma precisa utilizamos el modelo PIL, las muestras fueron obtenidas de la sutura en los siguientes tiempos: 2 horas y 1, 3, 5 y 7 días. La determinación de la carga bacteriana se realizó mediante la técnica PCR en tiempo real, cuantificando de manera absoluta los genes 16S ADN ribosomal basado en curva estándar. Mediante esta técnica pudimos determinar un aumento temprano de la carga bacteriana total desde el día 1, siendo significativo a partir del día 3. Además, este aumento de la carga bacteriana total se mantiene hasta el día 7. (Figura 3). Por lo cual podemos concluir que existe un aumento temprano de la carga bacteriana total que perdura hasta el día 7.

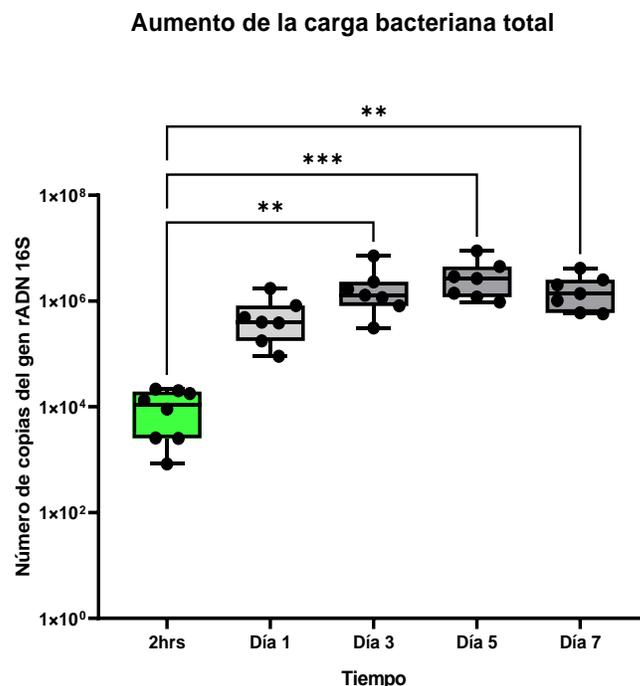


Figura 3. Aumento de la carga bacteriana durante periodontitis inducida por ligadura. El gráfico corresponde a cajas y clavijas, las líneas en cada caja corresponden al promedio y a los valores mínimos y máximos de cada grupo, la caja representa los valores entre el primer y tercer cuartil cada círculo corresponde a una muestra y los asteriscos a la significancia estadística; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, sin asterisco $p > 0.05$.

Aumento de la pérdida ósea durante periodontitis inducida por ligadura.

En periodontitis existe una destrucción del tejido de soporte del diente, incluyendo el hueso alveolar, el cual se midió determinando la distancia entre el límite amelocementario (LAC) y la cresta ósea alveolar (COA), en los cráneos de los mismos ratones de los cuales se obtuvo la muestra de ligadura. Se utilizó un registro fotográfico obtenido a partir de una lupa estereoscópica y una cámara, para luego medir las distancias en el programa Fiji. Mediante estas mediciones, pudimos determinar un aumento en la distancia entre LAC y COA, que inicia en el día 1 y se acentúa a partir del día 5, se observa una marcada diferencia al día 7 entre el grupo ligado y no ligado (Figura 4). Con estos datos pudimos determinar la pérdida ósea a través de la resta de la distancia entre LAC y COA del grupo ligado y no ligado y observamos un aumento de la pérdida ósea a partir del día 1, que es significativo y acentuado al día 5 y se continúa elevando al día 7 (Figura 5). Por lo tanto, podemos concluir que en modelo PIL existe una pérdida ósea, la cual se acentúa al día 5 y obtenemos el valor más alto al día 7.

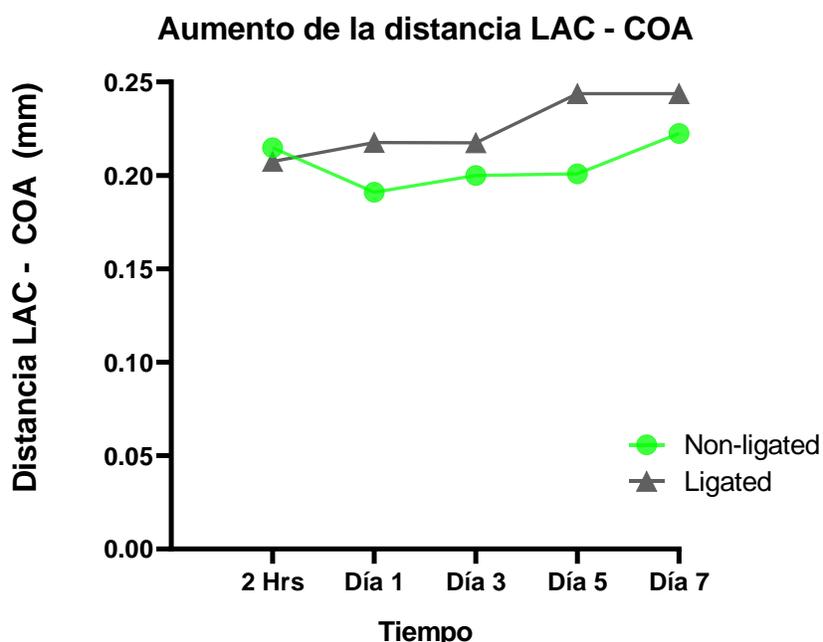


Figura 4: Aumento del promedio diario de la distancia LAC – COA. Corresponde a un gráfico de dispersión o XY, cada triángulo corresponde al promedio de la distancia LAC – COA determinada en cada tiempo en el grupo ligado, cada círculo corresponde al promedio de la distancia LAC – COA determinada en cada tiempo en el grupo no ligado.

Aumento de la pérdida ósea por día

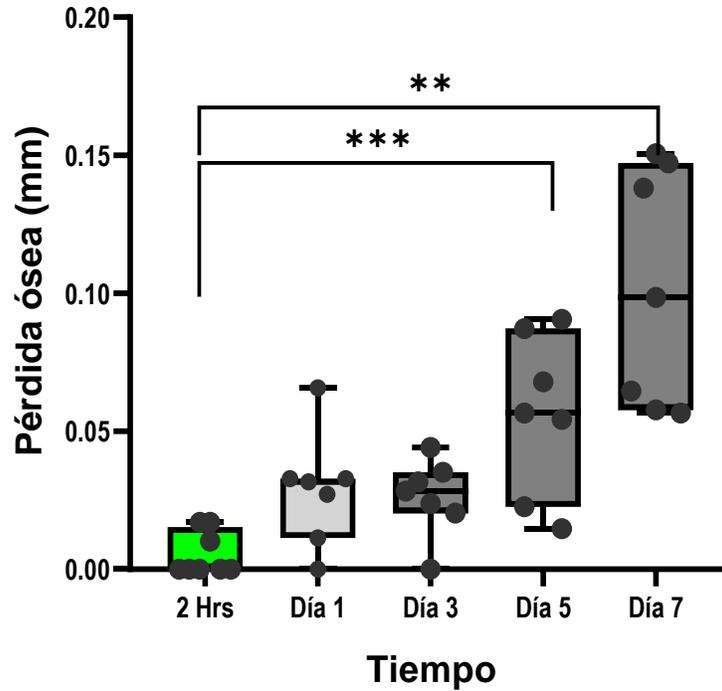


Figura 5: Aumento de la pérdida ósea. El gráfico corresponde a cajas y clavijas, la línea sobresaliente en cada barra corresponde al promedio y a los valores mínimos y máximos de cada grupo, la caja representa los valores entre el primer y tercer cuartil cada círculo corresponde a una muestra y los asteriscos a la significancia estadística; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, sin asterisco $p > 0.05$.

Correlación positiva entre carga bacteriana total y pérdida ósea.

Nuestros datos avalan un aumento de la carga bacteriana total y aseveran pérdida ósea en periodontitis inducida por ligadura, por lo que el siguiente paso fue determinar si existe una correlación entre ambos hallazgos. Para esto se hizo un análisis estadístico y se determina la correlación de Spearman. Al realizar este análisis con los datos de carga bacteriana total y distancia entre LAC y COA se obtiene un resultado de $r = 0.4998$, indicando una correlación positiva entre ambas variables (Figura 6). De la misma manera al realizar este análisis con los datos de carga bacteriana total y pérdida ósea, obtuvimos un resultado de $r = 0.5131$, indicando una correlación positiva entre ambas variables (Figura 7). Por lo tanto, podemos decir que existe una correlación positiva entre la carga bacteriana total y la pérdida ósea.

Correlación positiva CBT - Distancia LAC-COA

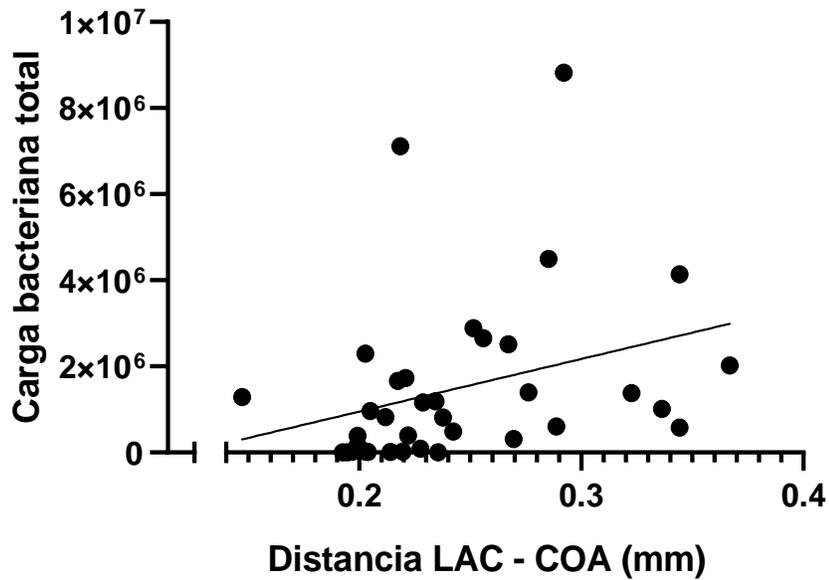


Figura 6: Correlación positiva entre CBT y distancia LAC – COA: La figura corresponde a un gráfico de matriz, los círculos corresponden a la carga bacteriana total en relación con la distancia LAC – COA (mm). Se observa la línea de tendencia que nos indica una correlación positiva con un $r = 4.998$.

Correlación positiva CBT - Pérdida ósea

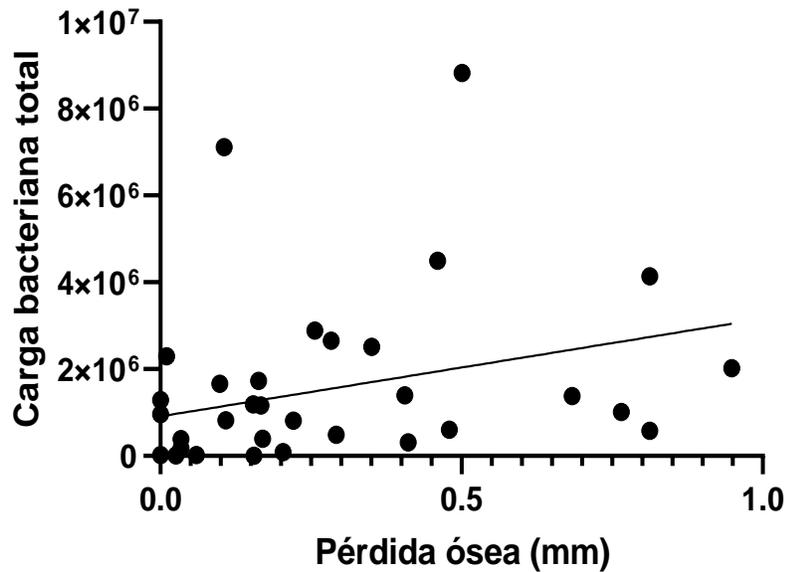


Figura 7: Correlación positiva entre CBT y pérdida ósea: La figura corresponde a un gráfico de matriz, los círculos corresponden a la carga bacteriana total en relación con la pérdida ósea (mm), se observa la línea de tendencia que nos indica una correlación positiva con un $r = 5.131$.

7) DISCUSIÓN:

En el presente trabajo de investigación, mediante el modelo de periodontitis inducido por ligadura y con la técnica de PCR en tiempo real para el gen 16S ADN ribosomal, se determinó la carga bacteriana total en los tiempos experimentales de 2 hrs y los días 1, 3, 5 y 7. Posteriormente fue determinada la pérdida ósea, la cual se realizó a través de un registro fotográfico y se realizaron las mediciones en 6 sitios predeterminados como se ha descrito anteriormente (Abe y Hajishengallis, 2013) y que corresponden a los mismos ratones de los cuales se obtuvieron las muestras de sutura. Finalmente se correlacionó la carga bacteriana total obtenida con la distancia entre el LAC y COA y con pérdida ósea.

Nuestros resultados demuestran en primera instancia un aumento en la carga bacteriana total durante periodontitis experimental, en segundo lugar, de un aumento de la pérdida ósea durante periodontitis experimental y por último de una correlación positiva entre ambos factores, en la literatura existen estudios que han evaluado estos parámetros, los cuales vamos a discutir a continuación.

En el estudio de Hajishengallis y cols del año 2011 (Hajishengallis y cols., 2011), se induce periodontitis en ratones mediante la inoculación con *P. gingivallis*, para luego ser evaluados a los 6 meses de progresión, con el objetivo de determinar el papel que *tiene P. gingivallis* en modificar el microbioma, en el desarrollo de periodontitis y en la pérdida ósea, se observa un aumento de la carga bacteriana total cultivable. Estos resultados son interesantes ya que independientemente de la utilización de otro modelo para inducir periodontitis experimental, ya se reporta que existe una mayor carga bacteriana total durante periodontitis experimental. Otras diferencias con nuestro trabajo son el método de cuantificación y los tiempos experimentales, ellos usaron cultivo microbiológico clásico (en condiciones de anaerobiosis) para cuantificar carga bacteriana y solo dos tiempos experimentales, en nuestro caso nos interesaba saber también cómo era la dinámica de forma más detallada, respecto al aumento de la carga bacteriana total por lo que se utilizaron más tiempos experimentales y para cuantificar usamos un método más preciso que es el PCR en tiempo real, que se diferencia de los cultivos en que en los últimos solo crecen las especies que pueden desarrollarse en

las condiciones experimentales proporcionadas.

En este mismo estudio del año 2011, donde se evalúa la pérdida ósea, observan que existía pérdida ósea debido a un proceso de inflamación leve, sin embargo, este proceso se ve acelerado en el grupo de ratones inoculados con *P. gingivallis*. Si bien la manera en que se induce periodontitis en este estudio es diferente a la que utilizamos en este estudio, los resultados que obtuvieron, al igual que los nuestros, corroboran que hay un aumento de la pérdida ósea en periodontitis. En su caso se puede explicar debido al rol que tiene *P. gingivallis* en modificar el microbioma subgingival, de manera que participa y promueve la patogénesis de la periodontitis, en nuestro caso es atribuible al acúmulo bacteriano (Hajishengallis y cols., 2011).

En un estudio de Abusleme del año 2013 (Abusleme y cols., 2013), donde se recolectan muestras de pacientes diagnosticados con periodontitis crónica y pacientes sanos, para luego cuantificar a través de PCR en tiempo real para el gen 16S ADN ribosomal, la carga bacteriana de géneros específicos y la carga bacteriana total, se demuestra que existe un aumento de la carga bacteriana total entre pacientes sanos y con periodontitis, este es un dato de relevancia porque se corrobora que existe este aumento en la carga bacteriana en periodontitis, esta vez en humanos, además en este caso si se realizó la cuantificación a través de PCR en tiempo real, al igual que en este trabajo, sin embargo al ser un estudio en humanos es de mayor dificultad la obtención de muestras y tampoco se puede intervenir al paciente para la obtención de datos sobre la dinámica del aumento de la carga bacteriana total en diferentes tiempos experimentales durante la transición de salud a enfermedad (Abusleme y cols., 2013).

Por otra parte, en el estudio de Abe y Hajishengallis del año 2013 (Abe y Hajishengallis., 2013), en el cual se utiliza el modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratones y se recolecta la muestra en los siguientes tiempos experimentales: 1, 3, 5 y 8 días, observaron un aumento en la carga bacteriana total cultivable, la cual tiene su punto más alto en el día 5. Estos resultados se asemejan de gran manera a los obtenidos por nosotros, se utilizó el mismo modelo experimental (Periodontitis inducida por ligadura) y utilizaron tiempos

experimentales que reflejan lo que sucede en el transcurso desde salud a enfermedad. Nosotros quisimos ahondar un poco más en lo que sucede durante esta transición, por lo que utilizamos tiempos experimentales similares, siendo la mayor diferencia el que nosotros agregamos el tiempo basal (2 hrs), por lo que se generan datos desde tiempos anteriores. Otro punto importante es nuevamente el método de cuantificación, Abe y Hajishengallis utilizaron el cultivo microbiológico clásico (en condiciones de anaerobiosis), la limitación de esto es que solo se van a cuantificar las bacterias que crecen bajo estas condiciones, además ellos hablan de las dificultades técnicas que tiene el hecho de cuantificar de esta manera, por otro lado, nosotros utilizamos el PCR en tiempo real que nos da acceso a datos más precisos, no obstante se llega a resultados muy similares, siendo el día 5 en el cual nos encontramos con una mayor carga bacteriana. En este mismo estudio se evalúa pérdida ósea en los mismos tiempos experimentales mencionados anteriormente y observan que aumenta conforme pasa el tiempo, lo cual se condice con nuestros resultados. Lo particular de este estudio es que sienta un poco las bases respecto al modelo de periodontitis inducido por ligadura, ellos determinan que como el hueso alveolar vestibular es más delgado en la zona apical que en la zona marginal, después del día 7, se generan defectos óseos como fenestraciones, que pueden generar colapsos, generando la falsa impresión de resorción ósea, lo que dificulta las mediciones, lo que justifica que nuestros tiempos experimentales lleguen hasta el día 7, además identifican 6 sitios que si son confiables para la medición de pérdida ósea y son los que se usaron en este trabajo para la obtención de datos, que se detallan en la sección de materiales y métodos. Por otro lado, hacen alusión a la relación que hay entre carga bacteriana total y pérdida ósea, realizaron un tratamiento antibiótico en ratones ligados y vieron que esto inhibía la pérdida ósea de manera significativa, esto se puede explicar por la importancia que tiene el aumento de la carga bacteriana para la patogénesis de la enfermedad, sin embargo, no se realizan análisis estadísticos que correlacionen ambas variables, por lo que nosotros comprobamos que efectivamente existe una correlación positiva entre el aumento de la carga bacteriana total y la pérdida ósea en el transcurso de periodontitis experimental. (Abe y Hajishengallis., 2013).

También podemos comparar nuestros resultados con el estudio de Tsukasaki y cols del año 2018 (Tsukasaki y cols., 2018), en el cual se usa el modelo de periodontitis inducida por ligadura en ratón y se recolecta la muestra al día 10, se determina carga bacteriana total mediante PCR en tiempo real y se compara entre el grupo intervenido (*Il-17^a -/-*) y el grupo control (WT), con el objetivo de conocer el papel de los linfocitos Th17 en cuanto a su respuesta antimicrobiana y en la regulación de la resorción ósea mediada por osteoclastos. Se observó una mayor carga bacteriana total en el grupo intervenido en comparación con el grupo control. Lo interesante de este estudio es que utiliza el mismo modelo experimental (Periodontitis inducida por ligadura) y también realiza la cuantificación mediante PCR en tiempo real, sin embargo, el objetivo del estudio es distinto al nuestro, además se muestran solo los datos obtenidos a los 10 días post colocación de la ligadura, no habiendo información para comparar el grupo control (WT) en un tiempo basal en comparación con el día 10. Otra diferencia relevante a considerar es que ellos utilizaron la sonda SYBR Green, la cual es inespecífica debido a que emite fluorescencia al encontrarse dentro de una doble hebra de ADN y nosotros utilizamos sondas Taqman personalizadas, la cual emite fluorescencia solo cuando ocurre la polimerización.

Por otro lado, ellos también evalúan pérdida ósea de manera similar a lo que se muestra en este trabajo, a través de la resta entre la distancia LAC – COA del grupo ligado menos el grupo no ligado, en este caso ellos ven que al inhibir las células Th17 se encuentran con una disminución de la pérdida ósea, esto se debe al papel que tienen estas células en la respuesta inmune del hospedero, participando en el proceso inflamatorio que posteriormente se traduce en pérdida ósea.(Tsukasaki y cols., 2018).

Por último, hay un estudio de Dutzan y cols (Dutzan y cols., 2018), en el que se quiere conocer más sobre el rol de las células Th17, que son un subtipo de linfocitos T CD4, cuando nos encontramos ante un microbioma disbiótico, se observa que existe un aumento en el número de linfocitos Th17, el cual es dependiente de IL-6 e IL-23, se observa también que la inhibición de las células Th17 genera disminución de la inflamación periodontal y disminución en la pérdida ósea, por lo que se preguntan si esta inhibición también nos llevaría a una

disminución en la carga bacteriana total en combinación con antibióticos. Observan que existe una mayor carga bacteriana total en los ratones a los que se les aplicó el modelo de periodontitis inducida por ligadura en comparación con el grupo control, también se observa que en el grupo de los ratones a los cuales se les indujo periodontitis y además se utilizaron antibióticos de amplio espectro en combinación con neomicina, disminuye significativamente la carga bacteriana total. En este mismo contexto observan que la pérdida ósea es mayor en el grupo al cual se le induce periodontitis en comparación con el grupo control, y también se ve que el uso de antibióticos disminuye la pérdida ósea. Si bien el objetivo de este estudio es diferente al nuestro, se utilizó el mismo modelo experimental, y se cuantificó la carga bacteriana de la misma manera que lo hicimos nosotros. De estos resultados también se desprende el hecho de que se necesita en primera instancia una acumulación bacteriana para que se desarrolle esta pérdida ósea inflamatoria, además nos indica que este acúmulo bacteriano tiene relación con la pérdida ósea, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Dutzan y cols., 2018).

En nuestro estudio se observó que la carga bacteriana total precede la pérdida ósea, lo que, sumado a la correlación positiva entre carga bacteriana total y pérdida ósea, confirman el antecedente ya conocido que dice que la periodontitis es una enfermedad que depende en gran medida de la microbiota presente en estrecha relación con en los tejidos periodontales (Socransky y Haffajee., 2005; Kornman., 2008).

Por lo tanto, el uso de técnicas de biología molecular y tiempos experimentales diferentes nos permiten describir de manera más precisa y exacta la dinámica del aumento en la carga bacteriana total, el hecho de que el aumento en la carga bacteriana total sea temprano y sostenido es un dato relevante ya que como dijimos anteriormente este aumento precede a la pérdida ósea. En el contexto clínico sabemos que además se puede controlar la acumulación bacteriana mediante una buena técnica de higiene y controles periódicos con el profesional (Chapple y cols., 2015) y si se controla este factor microbiano, vamos a estar previniendo de igual manera la pérdida de hueso alveolar. Este conocimiento viene a reforzar el fundamento de medidas actualmente aplicadas en el ámbito de promoción y prevención en

salud, ya que si se sientan buenas bases de prevención se podría evitar el desarrollo de periodontitis.

Llevando nuestros hallazgos a la práctica clínica, en la que se puede educar de mejor manera a los pacientes respecto a el desarrollo de periodontitis, sabiendo que existen cambios tempranos en el microbioma y la carga bacteriana total que influyen en el desarrollo de la enfermedad, recalando la importancia de la prevención y promoción en salud para evitar que la enfermedad se desarrolle, lo que también a futuro puede llegar a influir en la toma de decisiones respecto al tratamiento de la periodontitis.

8) CONCLUSIONES:

En conclusión, hemos cuantificado la biomasa del microbioma subgingival durante el transcurso de periodontitis experimental a través de ensayos PCR en tiempo real. Analizamos la pérdida ósea y determinamos la correlación que existe entre ambos factores, esto nos permite una comprensión más profunda de lo que sucede en el microbioma subgingival en la transición de salud a enfermedad.

El aumento temprano y sostenido de la carga bacteriana total que precede a el aumento de la pérdida ósea, sumado a su correlación positiva con esta, también nos confirma que la carga bacteriana es esencial en la patogénesis de periodontitis y se relaciona de forma directa con la severidad de esta.

Por otra parte, podemos avalar el uso del modelo de periodontitis inducido por ligadura, el cual nos permite la obtención de muestras en distintos puntos de tiempo para ser analizados mediante cultivos o en nuestro caso, técnicas de biología molecular como el PCR en tiempo real, además el uso de PCR en tiempo real es idóneo para cuantificar la carga bacteriana total, utilizando el gen 16S ADN ribosomal, el cual se encuentra presente en todas las especies bacterianas.

9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*, 394(1–2), 49–54.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002>
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B.-Y., & Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontology 2000*, 86(1), 57–78.
<https://doi.org/10.1111/prd.12362>
- Abusleme, L., Hong, B.-Y., Dupuy, A. K., Strausbaugh, L. D., & Diaz, P. I. (2014). Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1), 23990.
<https://doi.org/10.3402/jom.v6.23990>
- Buset, S. L., Walter, C., Friedmann, A., Weiger, R., Borgnakke, W. S., & Zitzmann, N. U. (2016). Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(4), 333–344.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12517>
- Cao, W., Liu, Y., Zhang, R., Zhang, B., Wang, T., Zhu, X., Mei, L., Chen, H., Zhang, H., Ming, P., & Huang, L. (2015). Homoharringtonine induces apoptosis and inhibits STAT3 via IL-6/JAK1/STAT3 signal pathway in Gefitinib-resistant lung cancer cells. *Scientific Reports*, 5(1), 8477. <https://doi.org/10.1038/srep08477>
- Chapple, I. L. C. (2014). Time to take periodontitis seriously. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 348(apr10 1), g2645. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2645>
- Chapple, I. L. C., Van der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., Madianos, P., Louropoulou, A., Machtei, E., Donos, N., Greenwell, H., Van Winkelhoff, A. J., Eren Kuru, B., Arweiler, N., Teughels, W., Aimetti, M., Molina, A., Montero, E., &

- Graziani, F. (2015). Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 Suppl 16, S71-6. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12366>
- Clark, R. B., Cervantes, J. L., Maciejewski, M. W., Farrokhi, V., Nemati, R., Yao, X., Anstadt, E., Fujiwara, M., Wright, K. T., Riddle, C., La Vake, C. J., Salazar, J. C., Finegold, S., & Nichols, F. C. (2013). Serine lipids of *Porphyromonas gingivalis* are human and mouse Toll-like receptor 2 ligands. *Infection and Immunity*, 81(9), 3479–3489. <https://doi.org/10.1128/IAI.00803-13>
- Darveau, R. P., Pham, T.-T. T., Lemley, K., Reife, R. A., Bainbridge, B. W., Coats, S. R., Howald, W. N., Way, S. S., & Hajjar, A. M. (2004). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity*, 72(9), 5041–5051. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5041-5051.2004>
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Greenwell-Wild, T., Abusleme, L., Zuazo, C., Ikeuchi, T., Brechley, L., Abe, T., Diaz, P. I., Holland, S. M., Belkaid, Y., Hajishengallis, G., & Moutsopoulos, N. M. (2018). Microbiota-triggered Th17 mediate oral barrier immunopathology in mice and humans. *Sci Trans Med*, 10(463).
- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., Aranda, W., Carvajal, P., & Arteaga, O. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology*, 81(10), 1403–1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>
- Grenier, D., Imbeault, S., Plamondon, P., Grenier, G., Nakayama, K., & Mayrand, D. (2001). Role of gingipains in growth of *Porphyromonas gingivalis* in the presence of human serum albumin. *Infection and Immunity*, 69(8), 5166–5172. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5166-5172.2001>
- Griffen, A. L., Beall, C. J., Campbell, J. H., Firestone, N. D., Kumar, P. S., Yang, Z. K., Podar, M., & Leys, E. J. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME Journal*, 6(6), 1176–1185. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.191>

- Hajishengallis, G. (2014). *The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota*. *Molecular Oral Microbiology*, 29(6), 248–257. <https://doi.org/10.1111/omi.12065>
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). *Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology*. *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hajishengallis, George, Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., McIntosh, M. L., Alsam, A., Kirkwood, K. L., Lambris, J. D., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2011). *Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement*. *Cell Host & Microbe*, 10(5), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.006>
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F. E., Vernal, R., Sorsa, T., & Gamonal, J. (2011). *Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis*. *Journal of Dental Research*, 90(10), 1164–1170. <https://doi.org/10.1177/0022034511401405>
- Hong, B.-Y., Furtado Araujo, M. V., Strausbaugh, L. D., Terzi, E., Ioannidou, E., & Diaz, P. I. (2015). *Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics*. *PloS One*, 10(5), e0127077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127077>
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). *Microbiota in health and diseases*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Keyes, P. H., & Jordan, H. V. (1964). *Periodontal lesions in the Syrian hamster. Iii. Findings related to an infectious and transmissible component*. *Archives of Oral Biology*, 9, 377–400. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(64\)90024-x](https://doi.org/10.1016/0003-9969(64)90024-x)
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). *Periodontal diseases*. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>

- Kirst, M. E., Li, E. C., Alfant, B., Chi, Y.-Y., Walker, C., Magnusson, I., & Wang, G. P. (2015). *Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 783–793. <https://doi.org/10.1128/AEM.02712-14>
- Kornman, K. S. (2008). *Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look*. *Journal of Periodontology*, 79(8 Suppl), 1560–1568. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>
- Kuboniwa, M., Hasegawa, Y., Mao, S., Shizukuishi, S., Amano, A., Lamont, R. J., & Yilmaz, O. (2008). *P. gingivalis accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle*. *Microbes and Infection*, 10(2), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.10.011>
- Lalla, E., & Papapanou, P. N. (2011). *Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases*. *Nature Reviews. Endocrinology*, 7(12), 738–748. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.106>
- Loe, H., Theilade, E., & Jensen, S. B. (1965). *Experimental gingivitis in man*. *The Journal of Periodontology*, 36(3), 177–187. <https://doi.org/10.1902/jop.1965.36.3.177>
- Morales, A., Strauss, F. J., Hämmerle, C. H. F., Romandini, M., Cavalla, F., Baeza, M., Sanz, M., & Gamonal, J. (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. <https://doi.org/10.1002/jper.21-0276>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions: Classification and case definitions for periodontitis*. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 Suppl 20, S162–S170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
- Reynolds, M. A. (2014). *Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease*. *Periodontology 2000*, 64(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/prd.12047>

- Rovin, S., Costich, E. R., & Gordon, H. A. (1966). *The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. Journal of Periodontal Research*, 1(3), 193–204. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01860.x>
- Schätzle, M., Loe, H., Bürgin, W., Anerud, A., Boysen, H., & Lang, N. P. (2003). *Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis: I. Role of gingivitis. Journal of Clinical Periodontology*, 30(10), 887–901. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2003.00414.x>
- Schincaglia, G. P., Hong, B. Y., Rosania, A., Barasz, J., Thompson, A., Sobue, T., Panagakos, F., Burleson, J. A., Dongari-Bagtzoglou, A., & Diaz, P. I. (2017). *Clinical, immune, and microbiome traits of gingivitis and Peri-implant mucositis. Journal of Dental Research*, 96(1), 47–55. <https://doi.org/10.1177/0022034516668847>
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). *Periodontal microbial ecology. Periodontology* 2000, 38(1), 135–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., & Otomo-Corgel, J. (2017). *Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 456–462. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>
- Tsukasaki, M., Komatsu, N., Nagashima, K., Nitta, T., Pluemsakunthai, W., Shukunami, C., Iwakura, Y., Nakashima, T., Okamoto, K., & Takayanagi, H. (2018). *Host defense against oral microbiota by bonedamaging T cells. Nat Commun*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03147-6>

7. ANEXOS.

1. CARTA PROYECTO FONDECYT N°. 11180505



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

2. CERTIFICADO N°: 19228-ODO-UCH



Santiago, a 24 de enero de 2019

Certificado n°: **19228-ODO-UCH**

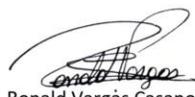
CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **FOUCH 181125**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Rol de la inflamación mediada por linfocitos Th 17 en la generación de disbiosis microbiana subgingival durante periodontitis”**, de la **Dra. Loreto Andrea Abusleme Ramos**, Profesor Asistente, Área de Microbiología, Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **100** ratones, *Mus musculus*, C57BL/6, provenientes de la Plataforma Experimental Bioterio, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, desde marzo de 2019 a enero de 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto Fondecyt de Iniciación Nro. 11180505**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.


Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl