



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL**

**CARACTERIZACIÓN SECUENCIAL DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL  
DURANTE EL TRANCURSO DE PERIODONTITIS EXPERIMENTAL**

**Jorge Ignacio Easton González**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Asistente Dra. Loreto Abusleme Ramos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asistente Dr. Nicolás Dutzan Muñoz**

**Prof. Asistente Dra. Anilei Hoare Teuche**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11180505  
Santiago - Chile  
2021**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL**

**CARACTERIZACIÓN SECUENCIAL DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL  
DURANTE EL TRANCURSO DE PERIODONTITIS EXPERIMENTAL**

**Jorge Ignacio Easton González**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Asistente Dra. Loreto Abusleme Ramos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asistente Dr. Nicolás Dutzan Muñoz**

**Prof. Asistente Dra. Anilei Hoare Teuche**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11180505  
Santiago - Chile  
2021**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, que siempre me apoyaron incondicionalmente para poder llegar hasta donde estoy. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios y mi perseverancia.

A mis hermanos, familiares y amigos, en especial a mi madre Margarita González, a mi tía Rosa Seguel y Walter Silva, por instarme a estudiar odontología en la Universidad de Chile, por sus consejos y cariño incondicional, brindándome lo necesario para ser de mí una mejor persona.

También agradecer todos los consejos y enseñanzas recibidos por los profesores durante esta carrera, que, sin duda, han aportado en mi formación.

A todos ellos,

Muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante este trabajo de investigación:

- A la Doctora Loreto Abusleme por la oportunidad de participar de este proyecto, por su dedicación, su calidad académica y ser guía en todo este trabajo de investigación.
- A la Doctora Anilei Hoare y al Doctor Nicolás Dutzan por formar parte del equipo de estudio en sus distintas etapas y su disposición para ayudar.
- A la Doctora Niki Moutsopoulos y su laboratorio en National Institutes of Health (NIH), que hicieron posible la realización de este proyecto.
- Al Laboratorio de Microbiología Oral y al Laboratorio de Investigación Traslacional Craneofacial de la Universidad de Chile.
- A todos los docentes, estudiantes y funcionarios que formaron parte la toma de muestras, procesamiento de información y diversos análisis de este estudio, que hicieron posible la realización de esta tesis.
- Al proyecto FONDECYT Iniciación 11180505.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	14
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN .....	25
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANÉXOS Y APÉNDICES .....	43

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Los cambios disbióticos en las comunidades microbianas subgingivales son esenciales para la patogénesis de la periodontitis, ya que desencadenan la inflamación y destrucción de los tejidos de soporte del diente. El análisis de la transición microbiana subgingival de salud a enfermedad es fundamental para dilucidar la dinámica que rige este proceso crítico para el establecimiento de la periodontitis.

**Materiales y Métodos:** Las muestras del microbioma subgingival provienen de experimentos realizados previamente utilizando el modelo de Periodontitis Inducida por Ligadura en ratones C57BL/6, a partir de los cuales se recolectaron muestras microbiológicas de forma secuencial, para su análisis posterior. Se comenzó con una muestra basal tomada 2 horas después de colocada la ligadura y luego se obtuvieron secuencialmente muestras desde el día 1 al día 5. Se aisló y se utilizó el ADN para la secuenciación masiva del gen 16S rDNA. Dichas muestras secuenciadas son las que han sido analizadas bioinformáticamente en la presente tesis. Las secuencias fueron preprocesadas, y agrupadas en unidades operacionales taxonómicas, definidas con un 3% de disimilitud. Se evaluaron las medidas de diversidad alfa y beta. Las diferencias en la abundancia relativa se determinaron mediante análisis LEfSE, y las diferencias en la diversidad alfa y beta se determinaron usando ANOVA con la prueba de Dunnet y el Análisis de varianza molecular (AMOVA), respectivamente.

**Resultados:** Se observó un aumento significativo en la diversidad de las comunidades microbianas al primer día colocada la ligadura (post muestra basal), manteniéndose durante todo el periodo de observación con una magnitud similar hasta el día 5. Luego del tiempo basal, observamos una marcada reducción de *Lactobacillus* sp. seguido de un aumento en *Enterococcus* sp., acompañado por una sobrerrepresentación de *Bacteroides* sp., que es significativa al día 4 post postura de la ligadura. Además, se observó un cambio global en la estructura microbiana basado en las distancias Theta Yue-Clayton asociadas con la ligadura.

**Conclusiones:** Los cambios disbióticos en las comunidades microbianas subgingivales surgen rápidamente y se mantienen durante la periodontitis experimental, lo que sugiere que una sucesión microbiana específica subyace en el desarrollo de la periodontitis.

## 2. INTRODUCCIÓN

La disbiosis microbiana es esencial para el establecimiento de la periodontitis. Sabemos que, en condiciones de salud periodontal, las comunidades microbianas que colonizan el área subgingival se encuentran en equilibrio con el hospedero, sin embargo, cuando este balance se pierde en un hospedero susceptible, comienzan a haber cambios en estas comunidades microbianas, pudiéndose dar inicio a lo que conocemos como periodontitis.

La periodontitis es una enfermedad de naturaleza inflamatoria que se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente y por la presencia de un microbioma subgingival disbiótico. Por lo tanto, el microbioma subgingival disbiótico es fundamental para la patogénesis de la periodontitis.

Es sabido que hay cambios dramáticos en la cantidad, estructura y composición de estas comunidades microbianas durante la enfermedad, sin embargo, la transición microbiana desde salud a periodontitis aún no ha sido suficientemente estudiada. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue:

“Caracterizar el microbioma subgingival de forma secuencial durante la periodontitis experimental en ratón”.

Lo anterior es de suma importancia para entender si hay o no una disbiosis progresiva del microbioma subgingival caracterizada por el aumento paulatino de bacterias anaerobias a medida que transcurre la enfermedad durante periodontitis experimental.

En cuanto a la metodología del trabajo, las muestras del microbioma subgingival se obtuvieron de experimentos previamente realizados en ratones y para esto, fue necesario determinar los cambios en la microbiota subgingival durante la periodontitis mediante el modelo de periodontitis inducida por ligadura. Luego se procesaron las muestras mediante el aislamiento de ADN y secuenciación masiva del gen 16S rRNA y partidores que amplificaban la región V4 del gen 16S rRNA. Finalmente, se realizó el análisis bioinformático (procesamiento de los datos)

utilizando el Software mothur. Además, todos los gráficos y análisis estadísticos requeridos, fueron realizados utilizando los softwares R y RStudio.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### Generalidades de la periodontitis

Las enfermedades periodontales se encuentran entre las enfermedades orales más comunes asociadas con el establecimiento de una biopelícula microbiana asociada a la zona subgingival que desencadena una respuesta inmune e inflamatoria en el hospedero (Eke y cols. 2012, Mayle y Chapple, 2015). La periodontitis es una enfermedad inflamatoria oral inducida por la microbiota disbiótica local, que se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte del diente, incluida la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar teniendo como consecuencia clínica la pérdida de inserción periodontal (Hernández y cols. 2011, Dutzan y cols. 2018). En la actualidad, la periodontitis es considerada como la sexta enfermedad más común en todo el mundo, con una prevalencia global del 11,2%, afectando a aproximadamente 743 millones de personas (Tonetti y cols. 2017). En Chile, se estima que un tercio de los adultos jóvenes y dos tercios de los adultos mayores presentan niveles de pérdida de inserción clínica severa (Gamonal y cols. 2010).

La progresión de esta enfermedad en su mayoría es lenta y puede producir movilidad dental, pérdida de función masticatoria, trastornos estéticos y, en última instancia, si no se trata, puede existir la pérdida del diente (Hernández y cols. 2011). La periodontitis representa un problema importante de salud pública que afecta la calidad de vida, la nutrición y la salud general de los pacientes (Buset y cols. 2016, Chapple, 2014). Debido a la proximidad anatómica de la biopelícula periodontal al torrente sanguíneo gingival, los sacos periodontales pueden actuar como reservorios de microorganismos y sus productos como mediadores inflamatorios que pueden diseminarse a otros sitios del cuerpo humano (Paju y Scannapieco, 2007, Han y Wang, 2013), asociándose con un mayor riesgo de varias afecciones sistémicas como diabetes tipo 2, artritis reumatoide, aterosclerosis, cáncer y resultados adversos del embarazo (Lalla y Papapanou, 2011, Reynolds, 2014).

## **La microbiota como factor iniciador de la periodontitis.**

La cavidad oral alberga uno de los microbiomas más diversos del cuerpo humano, que incluye virus, hongos, protozoos, arqueas y bacterias. Las comunidades bacterianas que se encuentran en la boca son altamente complejas con alrededor de 1000 especies presentes (Dewhirst y cols. 2010) y se ha demostrado que es el segundo más complejo en el cuerpo, después del colon (Scot y cols. 2012). Debido a esto, el microbioma oral humano es la segunda microbiota humana más estudiada y se han identificado aproximadamente 600 especies bacterianas (Aas y cols. 2005). De todas las especies, el 57% tiene nombre oficial, el 13% no tiene nombre pero se cultiva y el 30% se conoce únicamente como filotipos no cultivados (Tsute y cols. 2021).

La etiología de la periodontitis es multifactorial, aunque depende en gran medida de la microbiota que habita en el área subgingival (Socransky y Haffajee, 2005, Kornman, 2008). Estas comunidades bacterianas son capaces de desencadenar una respuesta inmune local desregulada que conduce primero a la inflamación y luego a la destrucción del tejido mediada por el hospedero (Kinane y cols. 2017). Numerosos estudios han establecido que se requiere una acumulación bacteriana para que se produzca inflamación en el periodonto. Investigaciones clásicas, como los estudios en humanos de gingivitis experimental realizados por Løe y colaboradores, han revelado que la reducción de la carga microbiana a través del tratamiento periodontal es capaz de resolver la inflamación local (Loe y cols. 1965). Por lo tanto, la microbiota subgingival es un factor clave para el inicio de la enfermedad periodontal.

Las diferencias entre las comunidades relacionadas con la salud y la enfermedad también son de naturaleza cualitativa, siendo los cambios en la estructura de la comunidad el principal factor asociado con la progresión de la enfermedad (Tanner y cols. 1979, Tanner y cols 1998). Así, se ha demostrado que las comunidades microbianas asociadas a enfermedad son más diversas que las comunidades asociadas a salud con especies específicas que muestran prevalencia y abundancia variables de acuerdo con el estado de salud gingival (Colombo y cols. 2009, Socransky y cols. 1998). Además, las diferencias en la estructura de la comunidad entre los sitios sanos y los afectados periodontalmente no solo son evidentes a nivel

de especie, sino también a nivel de cepa, con algunos genotipos específicos de especies individuales que muestran una prevalencia diferente en sujetos con salud y enfermedad periodontal (Amano y cols. 2004, Haubek, 2001).

A medida que avanza la enfermedad (pérdida de inserción y profundidad del saco), la microbiota disbiótica de transición se altera aún más por un aumento en la abundancia de especies predominantemente asociadas a la enfermedad, particularmente en la base del saco periodontal, lo que resulta en una infección sinérgica polimicrobiana oportunista (Van Dyke y cols. 2020). Las bacterias asociadas a la enfermedad son un componente muy pequeño de la microbiota subgingival en la salud y aumentan significativamente con el desarrollo de los sacos periodontales y periodontitis (Kirst y cols, 2015, Riep y cols. 2009). Estas comunidades organizadas como biopelículas subgingivales habitan un nicho ambiental complejo; aprovechan las superficies radicales duras y están sujetos a la afluencia permanente de fluido crevicular gingival (FCG), que contiene macromoléculas derivadas del hospedero que sirven como nutrientes para la comunidad, pero también células inmunes y otros mediadores (Keijser y cols. 2008).

Las bacterias de la biopelícula están incluidas en una matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular. La formación de biopelículas subgingivales y su adaptación continua a las condiciones ambientales cambiantes se rige por un equilibrio dinámico entre los microorganismos, la respuesta inmune del hospedero celular y humoral, y una multitud de productos anabólicos y catabólicos y factores de señalización producidos tanto por la microbiota como por los tejidos periodontales (Listgarten, 2000).

Las ecologías microbianas complejas se definen por todas las interacciones mutuas que determinan la abundancia, localización y actividades de sus miembros (Amann, 2000). La biopelícula subgingival muestra una estratificación desde la superficie de la raíz hacia el revestimiento del epitelio. Las capas basales, intermedias, superiores y externas parecen proporcionar una estructura general de la biopelícula con las especies correspondientes asociadas con cada capa (Amann, 2000). Además, estas biopelículas microbianas son comunidades dinámicas expuestas a un entorno en constante cambio. Por lo tanto, la arquitectura delineada de la biopelícula subgingival

no debe verse como una estructura rígida, sino más bien como un consorcio en constante cambio que está influenciado por el crecimiento bacteriano, la adhesión y el desprendimiento de los microorganismos a la biopelícula, la respuesta inmune inflamatoria del hospedero, las medidas de higiene oral del hospedero y las condiciones nutricionales definidas por el nicho ecológico. Además, esta microbiota asociada a la periodontitis aumenta en biomasa con el aumento de la inflamación periodontal. Por lo tanto, el crecimiento selectivo de estos patobiontes inflamatorios puede perpetuar la inflamación periodontal, lo que resulta en un círculo vicioso para la progresión de la enfermedad, donde la disbiosis y la inflamación se refuerzan mutuamente (Bartold y Van Dyke, 2017).

Las bacterias orales varían ampliamente en su sensibilidad al oxígeno, existiendo relativamente pocas especies de anaerobios obligados en la boca. Curiosamente, se ha demostrado que los miembros de la comunidad bacteriana oral pueden cooperar para protegerse mutuamente del estrés atmosférico (Bradshaw, 1996). Las comunidades microbianas asociadas con la salud periodontal están dominadas por bacterias Gram positivo facultativas como *Streptococcus* spp., *Rothia* spp. y *Actinomyces* spp. Durante el inicio de la gingivitis, las bacterias dominantes en la microbiota subgingival cambian gradualmente de *Streptococcus* spp. a *Capnocytophaga* spp., *Campylobacter* spp., *Eikenella* spp., *Fusobacterium* spp. y *Prevotella* spp. (Moore y cols. 1987, Zaura y cols. 2009, Trombelli y cols. 2013). En contraste, las comunidades asociadas con periodontitis se han caracterizado por un enriquecimiento de bacterias anaerobias, principalmente de especies Gram negativo (Silva y cols. 2015, Socransky y Haffajee, 2005). Entre estas últimas, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, se han considerado clásicamente como agentes etiológicos de periodontitis debido a su potencial patogénico y asociación con la enfermedad (Socransky y cols. 1998). Debe haber una razón para la extrema diversidad y variabilidad dentro de las especies desde salud a enfermedad. Presumiblemente, esta diversidad brinda versatilidad a la comunidad y la capacidad de responder a las tensiones ambientales de la manera más adecuada.

## **Alteraciones de la ecología subgingival y su influencia en las comunidades microbianas.**

La relación del microbioma periodontal con el desarrollo de periodontitis es compleja. De los análisis de microbioma de muestras de placa tomadas de sitios sanos, de gingivitis y de periodontitis temprana, sabemos que las bacterias asociadas con el inicio de la enfermedad son en gran medida comensales y que los "supuestos patógenos o patobiontes" que se han asociado con la enfermedad en una etapa posterior son componentes menores de la biopelícula en esta etapa temprana (Kirst y cols. 2015). El cambio a un microbioma disbiótico se debe en gran parte a un exceso de bacterias con mayor potencial patogénico, inflamación persistente y a la formación de sacos periodontales que cambia el ambiente de crecimiento bacteriano. Esto se reconoció por primera vez a principios de la década de 1990 como la hipótesis de la placa ecológica (Marsh, 1994). En esta hipótesis, el ambiente subgingival ejerce una presión selectiva que cambia la composición microbiana específica que conduce el cambio de salud a enfermedad.

El nexo entre la inflamación periodontal y la biopelícula en el surco gingival es fundamental para comprender la patogénesis de la periodontitis. La presencia de respuestas inflamatorias exageradas del hospedero que conducen a la pérdida de inserción periodontal es la característica principal de la periodontitis (Hernández y cols. 2011). Esta destrucción de tejido mediada por el hospedero y su interacción con la microbiota provoca cambios significativos en el entorno periodontal tales como: la generación de varios subproductos de destrucción tisular, el aumento del flujo de FCG (un exudado a base de suero), la disminución de la tensión de oxígeno, elevación del pH local y la temperatura (Marsh, 2003). Estas alteraciones ecológicas impactan la microbiota subgingival y pueden actuar como determinantes que impulsan las sucesiones microbianas que terminan en el establecimiento de comunidades disbióticas, enriquecidas en aquellas especies cuyo crecimiento es favorecido en condiciones de inflamación. Por lo tanto, se ha propuesto que las comunidades asociadas con la periodontitis son "inflamofílicas", ya que participan en un ciclo vicioso en donde estas comunidades disbióticas florecen y, a su vez, gatillan y perpetúan destrucción inflamatoria de los tejidos periodontales (Eskan y cols. 2012, Hajishengallis, 2014). En concordancia con esta teoría, nuestro grupo de investigación

ha reportado un aumento significativo de la biomasa bacteriana en sitios inflamados (con sangrado al sondaje) de pacientes con periodontitis (Abusleme y cols. 2013). Podemos establecer entonces que las comunidades microbianas en el contexto de periodontitis se ven influenciadas por la inflamación, pero aún no se sabe con precisión cómo van cambiando a medida que se comienza a generar la pérdida de hueso alveolar. Estudios clínicos que se han enfocado en el microbioma periodontal asociado a salud, gingivitis y periodontitis, demuestran que existe una composición microbiana característica de cada estado y que probablemente hay una transición microbiana que guía el enriquecimiento de especies asociadas con periodontitis (Díaz y cols. 2016). Sin embargo, por razones éticas y experimentales, la transición microbiana entre salud y periodontitis no ha sido estudiada de forma controlada, considerando al paciente como unidad de observación.

### **Técnicas de secuenciación masiva y su aporte al entendimiento del microbioma subgingival.**

La investigación que compara la microbiota subgingival en diferentes condiciones periodontales se ha llevado a cabo utilizando diversas técnicas moleculares basadas en genes bacterianos conservados. El gen más comúnmente utilizado para este propósito ha sido el que codifica la subunidad ribosomal 16S (Pace y cols. 1986). El 16S rRNA en sí mismo puede aislarse directamente y secuenciarse (Ward y cols. 1990), pero más típicamente el gen que codifica el 16S rDNA se amplifica por PCR utilizando partidores "universales" dirigidos a las regiones ultraconservadas del gen. Se ha demostrado que las comparaciones de secuencias de rRNA son útiles para establecer la identidad de la especie, y una similitud de secuencia del 97% en toda la longitud del gen 16S rDNA se usa comúnmente como el límite para definir una especie (Kilian y cols. 2008, Christensen y cols. 1998), en donde se usan los términos "filotipo" o unidad taxonómica operativa (OTU), en lugar de especies, para indicar un grupo de organismos que comparten un cierto nivel de similitud en su secuencia de del gen 16S rDNA (Schloss, 2010).

Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación de última generación para la caracterización microbiana, como por ejemplo la secuenciación masiva basada en el gen 16S rRNA, se ha proporcionado una descripción más completa del microbioma

periodontal. Este avance nos ha permitido apreciar con mucha mejor resolución los cambios microbianos asociados con la periodontitis y ha revelado que son más complejos de lo que se pensaba previamente (Diaz y cols. 2016).

Estudios clásicos que evalúan la evolución de la microbiota asociada al margen gingival durante la abstención de la higiene oral muestra un cambio desde el predominio de cocáceas Gram positivo durante los primeros días de acumulación de placa, a un aumento de los morfotipos Gram negativo, incluidos bacilos, formas filamentosas y las espiroquetas después de dos o tres semanas (Mira-Pascual y cols. 2015, Darveau y cols. 1998) correlacionando estos cambios con la aparición de signos clínicos de gingivitis. Estudios recientes que utilizan la técnica de secuenciación de última generación basada en los genes 16S rDNA junto con modelos experimentales de acumulación de placa concuerdan con los estudios de cultivo clásicos, pero definen, con mayor precisión, la taxonomía molecular de los cambios durante el inicio de la gingivitis (Mira-Pascual y cols. 2015, Mira y cols. 2017). El microbioma se vuelve más complejo durante gingivitis con el enriquecimiento de una gran variedad de taxones, de acuerdo con un aumento en la diversidad según lo informado por la secuenciación masiva (Huang y cols. 2014).

La secuenciación de última generación del gen 16S rDNA ha permitido una visión amplia del microbioma subgingival proporcionando una mejor comprensión de los cambios asociados con el desarrollo de periodontitis. El uso de estos enfoques de secuenciación masiva, nos ha permitido evidenciar que la periodontitis se asocia con la presencia de comunidades polimicrobianas disbióticas en el área subgingival (Griffen y cols. 2012, Abusleme y cols. 2013, Kolenbrander y cols. 1998).

### **Modelo experimental de periodontitis inducida por ligadura.**

Los modelos animales y los cultivos celulares han aportado nuevos conocimientos en ciencias biológicas, incluida la periodoncia. No obstante, las células cultivadas se pueden usar para estudiar los procesos fisiológicos que ocurren durante la patogénesis de la periodontitis, la respuesta compleja del hospedero fundamentalmente responsable de esta enfermedad no se puede reproducir *in vitro*. Entre el reino animal, se han utilizado roedores, conejos, cerdos, perros y primates

para modelar la periodontitis humana, cada uno con sus ventajas y desventajas (Helieh y Puleo, 2011).

Los modelos experimentales para la periodontitis en ratones han sido muy beneficiosos e importantes para examinar varias hipótesis biológicas en complicaciones fisiológicas y reproducir las características radiográficas, clínicas, moleculares e histológicas de la periodontitis humana (Anbinder y cols. 2016, Cavagni y cols. 2016). Los modelos animales de enfermedad periodontal permiten estudiar los mecanismos celulares y moleculares, así como los mediadores biológicos involucrados durante el establecimiento y la progresión de la enfermedad y proporcionan información valiosa sobre las interacciones hospedero-microorganismo y la inflamación (Anbinder y cols. 2016; Cavagni y cols. 2016). En este punto, el modelo de periodontitis inducida por ligadura (PIL) se ha utilizado con frecuencia en la investigación periodontal debido a la participación de bacterias comensales nativas en especies animales con características de virulencia distintas, incluidas toxinas, patrones moleculares asociados a patógenos y productos del metabolismo microbiano (Souza y cols. 2011). La periodontitis comúnmente se ha inducido al colocar una ligadura retentiva de placa bacteriana en el surco gingival alrededor de los dientes molares. Los estudios con roedores han provocado la enfermedad mediante la colocación de ligaduras en el surco gingival alrededor de los dientes molares al aumentar la acumulación de biopelículas, interrumpir el epitelio gingival, inducir la osteoclastogénesis y la pérdida ósea (Cai y cols. 2008).

El modelo experimental de PIL es de gran utilidad, ya que la enfermedad puede iniciarse en un momento conocido desencadenando una secuencia de eventos que culminan en la pérdida de hueso alveolar en pocos días (Bezerra y cols. 2000; Li y Amar, 2007; Graves y cols. 2008; Abe y cols. 2012). El procedimiento técnico implica la colocación de ligaduras (generalmente de seda o algodón) alrededor de los dientes posteriores (Assuma y cols. 1998; Oz y Puleo, 2011). Se postula que las ligaduras facilitan la acumulación local de bacterias y, por lo tanto, mejoran la inflamación mediada por bacterias y la pérdida ósea (Graves y cols. 2008). La colocación de una ligadura en el segundo molar facilita la acumulación local de

bacterias y, por lo tanto, induce la inflamación mediada por la microbiota que se torna disbiótica y termina por producir pérdida ósea (Graves y cols. 2008). Una ventaja relevante del modelo PIL para el estudio de la microbiota, es que permite la evaluación directa de las comunidades microbianas que se acumulan en la ligadura, la cual puede removerse y analizarse fácilmente ofreciendo la posibilidad de estudiar la microbiota asociada a periodontitis de forma secuencial y dinámica, a medida que progresa la pérdida ósea (Abe y Hajishengallis. 2013).

A través de la utilización de este modelo, se ha definido que a los 5 días de colocación de la ligadura ocurren cambios marcados en la composición y estructura de la microbiota en comparación al estado basal (sin ligadura), además de una pérdida de hueso alveolar significativa (Dutzan y cols. 2018, Tsukasaki y cols. 2018). A pesar de su etiología multifactorial, la periodontitis humana representa fundamentalmente la interrupción de la homeostasis del tejido periodontal (Darveau, 2010). En este sentido, la colocación de ligaduras en efecto interrumpe la homeostasis periodontal (al facilitar una fuerte acumulación local de bacterias). Por otro lado, la eliminación de las ligaduras (por ejemplo, en el día 5) puede causar una transición a la fase de resolución. Al analizar el microbioma asociado a la ligadura después de los 5 días de PIL, se evidencia un cambio dramático en la composición de dichas comunidades, en donde se observa un predominio en algunos casos de Enterobacterias (fundamentalmente *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp.) y en otros estudios de *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas* sp. (Kitamoto y cols., 2020, Dutzan et al. 2018). Además de estas especies dominantes, Dutzan y cols. también observaron un aumento de especies bacterianas anaerobias, pertenecientes a las familias *Porphyromonadaceae*, *Lachnospiraceae* y *Erysipelotrichaceae*., entre otros taxones (Dutzan y cols. 2018). Sin embargo, aún no existen estudios que analicen como van cambiando paulatinamente dichas comunidades desde salud (antes de poner la ligadura) a periodontitis (5 días post ligadura). Este análisis es de gran relevancia para comprender de mejor manera uno de los aspectos más importantes en la patogénesis de la periodontitis, que se refiere a cómo ocurren las sucesiones microbianas durante el establecimiento de las comunidades disbióticas características de esta enfermedad.

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 HIPÓTESIS.**

Tomando en consideración los antecedentes que documentan cambios profundos en las comunidades asociadas a periodontitis experimental, proponemos la siguiente hipótesis:

“Existe una disbiosis progresiva del microbioma subgingival caracterizada por el aumento paulatino de bacterias anaerobias a medida que ocurre la pérdida de hueso alveolar durante periodontitis experimental”.

### **4.2 OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar secuencialmente los cambios que ocurren en el microbioma subgingival durante periodontitis experimental.

### **4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

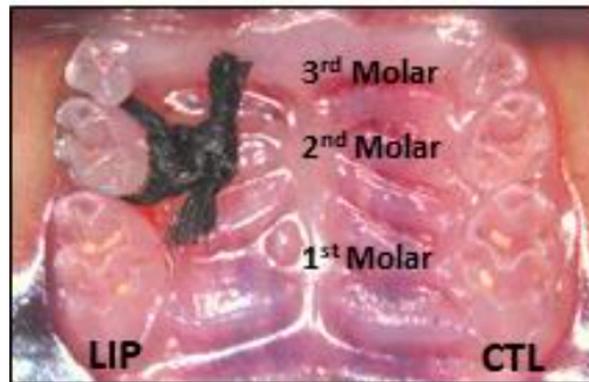
1. Evaluar la diversidad del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.
2. Evaluar los cambios en la estructura del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.
3. Evaluar los cambios en la abundancia relativa de especies bacterianas del microbioma subgingival durante periodontitis experimental.

## 5. METODOLOGÍA

El desarrollo de esta tesis cuenta con el financiamiento y apoyo del Proyecto FONDECYT de Iniciación N°11180505 (Ver Anexo 1).

### ***Animales y modelo experimental de Periodontitis Inducida por Ligadura***

Las muestras de microbioma subgingival que se analizaron en esta tesis, provienen de experimentos que fueron previamente realizados en ratones de la cepa C57BL6. Para determinar los cambios en la microbiota subgingival durante periodontitis, se utilizó un modelo murino de periodontitis inducida por ligadura (Abe y Hajishengallis, 2013). Como se mencionó anteriormente, en el modelo de PIL, la colocación atraumática de una sutura de seda (ligadura) alrededor del segundo diente molar conduce a la acumulación local de bacterias y a la inflamación gingival, seguida de la destrucción del hueso alveolar que es medible desde el quinto día (Figura 1). Se procedió entonces a la recolección secuencial de muestras microbiológicas para su análisis posterior, comenzando con una muestra basal (antes de la colocación de las ligaduras) y a los días 1, 2, 3, 4 y 5 post-colocación de la ligadura. Es importante señalar que estos experimentos se realizaron con la aprobación del NIDCR Animal Care and Use Committee (ACUC) (de los National Institutes of Health, Estados Unidos), en el marco del ASP 16-804 (Protocolo de trabajo con animales de la misma institución).



**Figura 1. Modelo de periodontitis inducido por ligadura.** Colocación atraumática de una sutura de seda (ligadura) alrededor del segundo molar que lleva a la acumulación local de bacterias, inflamación gingival y finalmente a la destrucción del hueso alveolar medible desde el quinto día. Dutzan y cols., 2018.

### ***Extracción de ADN y secuenciación basada en el gen 16S rDNA***

Estos procedimientos experimentales también han sido realizados con anterioridad, de manera que las secuencias bacterianas de cada muestra ya se encontraban disponibles para su análisis bioinformático, el cual fue realizado en la presente Tesis. Brevemente, para el aislamiento de DNA se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción del DNeasy Tissue and Blood Kit (Qiagen) descrito en detalle en Abusleme y cols. (Abusleme y cols. 2017). Para la secuenciación masiva del gen 16S rRNA, se utilizó la plataforma MiSeq (Illumina) y partidores que amplificaban la región V4 del gen 16S rRNA, como ha sido descrito en Dutzan y cols. (Dutzan y cols. 2018).

### ***Análisis Bioinformático***

#### a) Pre-procesamiento de las secuencias

Para el procesamiento bioinformático de los datos se utilizó el software mothur (<http://www.mothur.org>) (Schloss y cols. 2009). En primer lugar, las secuencias correspondientes a cada muestra, fueron ensambladas en *contigs*. En el siguiente paso, se eliminaron los partidores, las secuencias espaciadoras y las secuencias

índices que diferenciaban a cada muestra. Después se procedió a filtrar los *contigs* de acuerdo a su tamaño (incluyendo sólo secuencias que tengan desde 200 hasta 400 pares de bases, bp) y a la presencia de ambigüedades en las secuencias (no se admitieron asignaciones de bases ambiguas). Los pasos siguientes del pre-procesamiento, utilizaron el protocolo estándar establecido ([https://mothur.org/wiki/miseq\\_sop/](https://mothur.org/wiki/miseq_sop/)) (Kozich y cols. 2013), que será detallado a continuación. Para facilitar el análisis en términos de la capacidad computacional requerida, se utilizó el comando `unique.seqs`, para trabajar sólo con aquellas secuencias únicas lo que facilita la siguiente etapa de alineamiento. En el paso siguiente se procedió a alinear las secuencias utilizando como base los archivos de referencia SILVA, que será ajustado a la región de interés (región variable V4 del gen 16S rDNA). Posteriormente, se procedió a filtrar el alineamiento, a re-agrupar las secuencias permitiendo pocas diferencias entre ellas (usando el comando `pre.cluster`) y a eliminar las secuencias quiméricas, utilizando el algoritmo VSEARCH, (Rognes y cols. 2016). Para la asignación de la identidad taxonómica, las secuencias fueron clasificadas utilizando la última versión implementada en mothur del Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang et al., 2007) con un *cutoff*=80.

b) Determinación de Unidades Operacionales Taxonómicas

Para llevar a cabo estos análisis, las secuencias fueron agrupadas en OTUs utilizando un criterio de similitud del 97%. Cada OTU fue clasificada taxonómicamente hasta el nivel de género, basado en la taxonomía de consenso usando el parámetro estándar (51%). Para mejorar la resolución taxonómica, la secuencia representativa de cada OTU fue comparada a través de BLAST utilizando la base de datos NCBI 16S rRNA y si se alcanzó un nivel mayor a 97% de similitud y cobertura, la especie encontrada fue reportada entre paréntesis, como parte del nombre de cada OTU.

c) Cálculo de abundancia relativa

Para determinar la abundancia relativa se utilizó el comando `get.relabund` el cual calcula la abundancia de cada OTU en una muestra.

d) Análisis de  $\alpha$ -diversidad

Para estos análisis, primero se procedió a normalizar el número de secuencias por muestra a considerar, seguido del cálculo de los parámetros de  $\alpha$ -diversidad, que incluyeron el Índice de diversidad de Shannon (versión no paramétrica) y estimadores de riqueza (número de OTUs detectados por muestra).

e) Análisis de  $\beta$ -diversidad

Primero se calculó una matriz de distancias a nivel de OTUs basada en el Yue and Clayton Theta Similarity coefficient, el cual es una medida utilizada para evaluar la estructura de las comunidades microbianas. Esta matriz se visualizó utilizando análisis de coordenadas principales “PCoA” (Principal Coordinates Analysis).

f) Análisis estadísticos y visualización de los datos

Para la comparación de diversidad entre muestras, se analizó la distribución de los datos (normal, no normal) utilizando el software RStudio y las pruebas de Anderson-Darling, Pearson chi-square y Shapiro-Wilk, de acuerdo con eso se eligió el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas. Para la comparación de la estructura de las comunidades, la separación estadísticamente significativa de las muestras se analizó con el test de AMOVA (Analysis of Molecular Variance), como se encuentra implementado en `mothur`. Para la comparación de la abundancia relativa de OTUs, se utilizó el método de LEfSe (Segata y cols. 2011). Este último es un algoritmo para biomarcadores que identifica las características genómicas (de genotipos, vías de señalización o especies microbianas) que permite determinar las diferencias estadísticas entre dos o más condiciones biológicas. Todos los gráficos y otros análisis estadísticos requeridos, fueron realizados utilizando los softwares R y RStudio.

## 6. RESULTADOS

En la tabla 1 se observa el número total de secuencias inicial previo al pre procesamiento de los datos siendo un total de 2.439.649 secuencias. También se encuentra el número total de secuencias final post procesamiento de los datos siendo un total de 1.735.730 secuencias.

El promedio de las secuencias totales con las que se trabajó para la determinación de unidades operacionales taxonómicas fue de  $59.994 \pm 90.363$  secuencias. Finalmente, se observa el número de secuencias determinado para la normalización de los datos siendo un total de 34.750 por muestra. Es importante señalar que en este paso se eliminaron tres muestras basales debido a que la primera muestra no se pudo tomar, la segunda muestra se eliminó debido a que tenía un número de secuencias muy baja (eliminada de forma automática por el programa) y por último, se eliminó una tercera muestra debido a que no se comportaba de igual forma a las demás muestras comparando todos los datos. Es importante la normalización o estandarización en el número de secuencias que hay en cada muestra porque al analizar la diversidad se necesita que todas las muestras tengan el mismo número de secuencias.

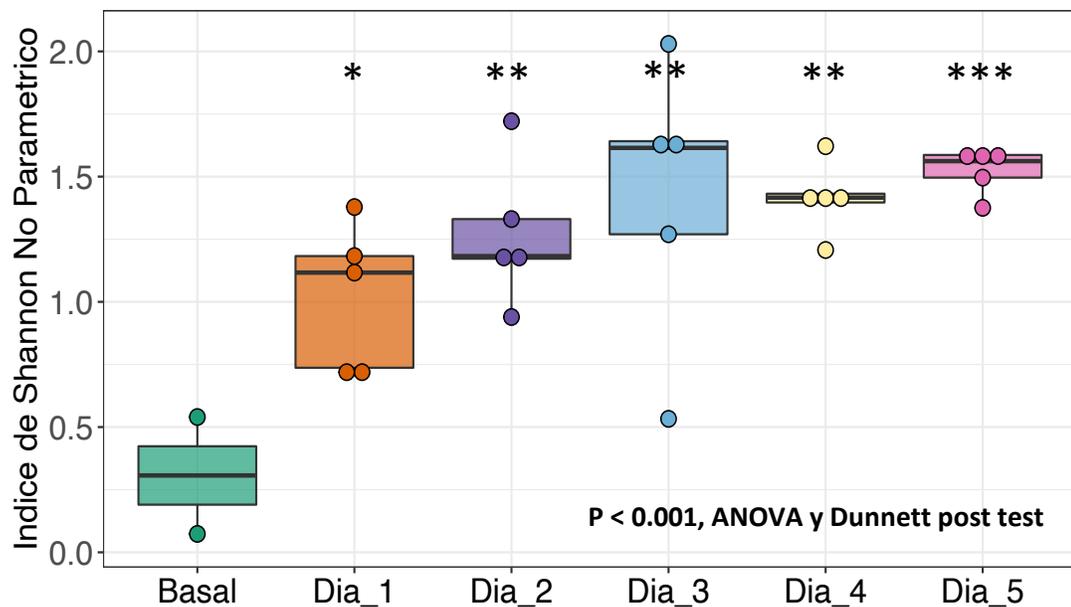
**Tabla 1:** Tabla resumen. Número de secuencias durante el Pre-procesamiento de datos.

<b>Nº total de secuencias inicial</b>	<b>Nº total de secuencias final (Post procesamiento)</b>	<b>Promedio de secuencias por muestra <math>\pm</math> D S*</b>	<b>Nº de secuencias para normalización (Sub.Sample)</b>
2.439.649	1.735.730	$59.994 \pm 90.363$	34.750

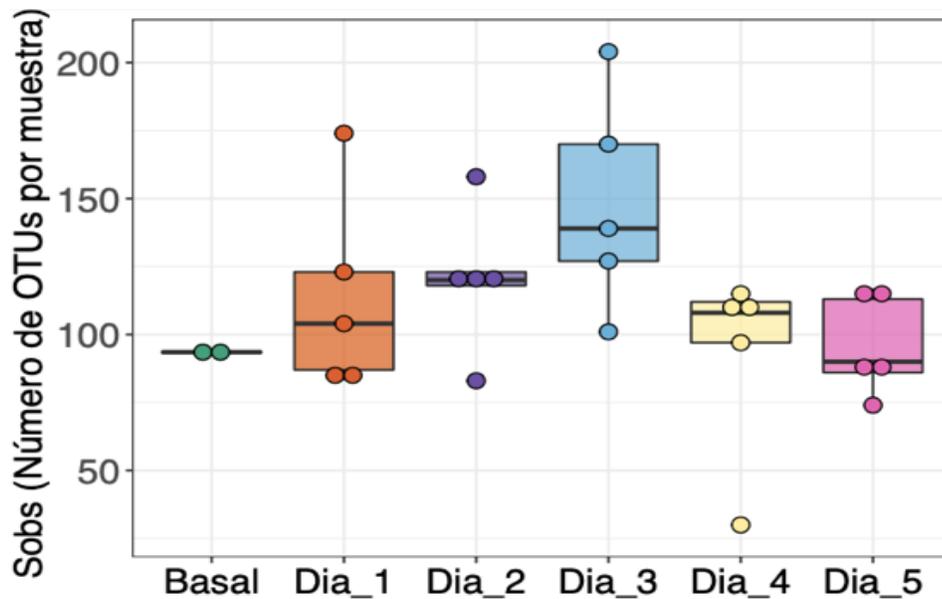
\*D S: desviación estándar.

De acuerdo a lo obtenido, podemos ver el aumento en diversidad (Gráfico 1) y número de especies detectadas (Gráfico 2) asociados al establecimiento de la periodontitis. En el gráfico 1 se muestra la comparación de diversidad entre las

muestras basal y las obtenidas entre los días 1 y 5, es decir, diferencias en la cantidad y abundancia relativa de las OTUs presentes en cada muestra relacionados con alfa diversidad (parámetros que vemos al interior de cada muestra). Se utilizó el Índice de Shannon en su versión no paramétrica, ya que al realizar el test estadístico de comparaciones múltiples ANOVA, se observa que es estadísticamente significativo ( $P < 0.001$ ). Podemos ver un aumento estadísticamente significativo de la diversidad cuando se comparan las muestras del día 1 al día 5 con el basal, donde la diversidad aumenta significativamente desde el día 1 y conforme van pasando los días hasta el día 5. Se observa una tendencia a la estabilización desde el día 3 al término del tiempo experimental. Además, para determinar la diversidad de las muestras (riqueza de las especies), se obtuvo el número de OTUs por muestra para cada grupo (Gráfico 2), donde podemos observar que aumenta conforme van pasando los días desde el día 1 al día 3, sin embargo, en el día 4 y 5 se aprecia una reducción del número de OTUs por muestra.

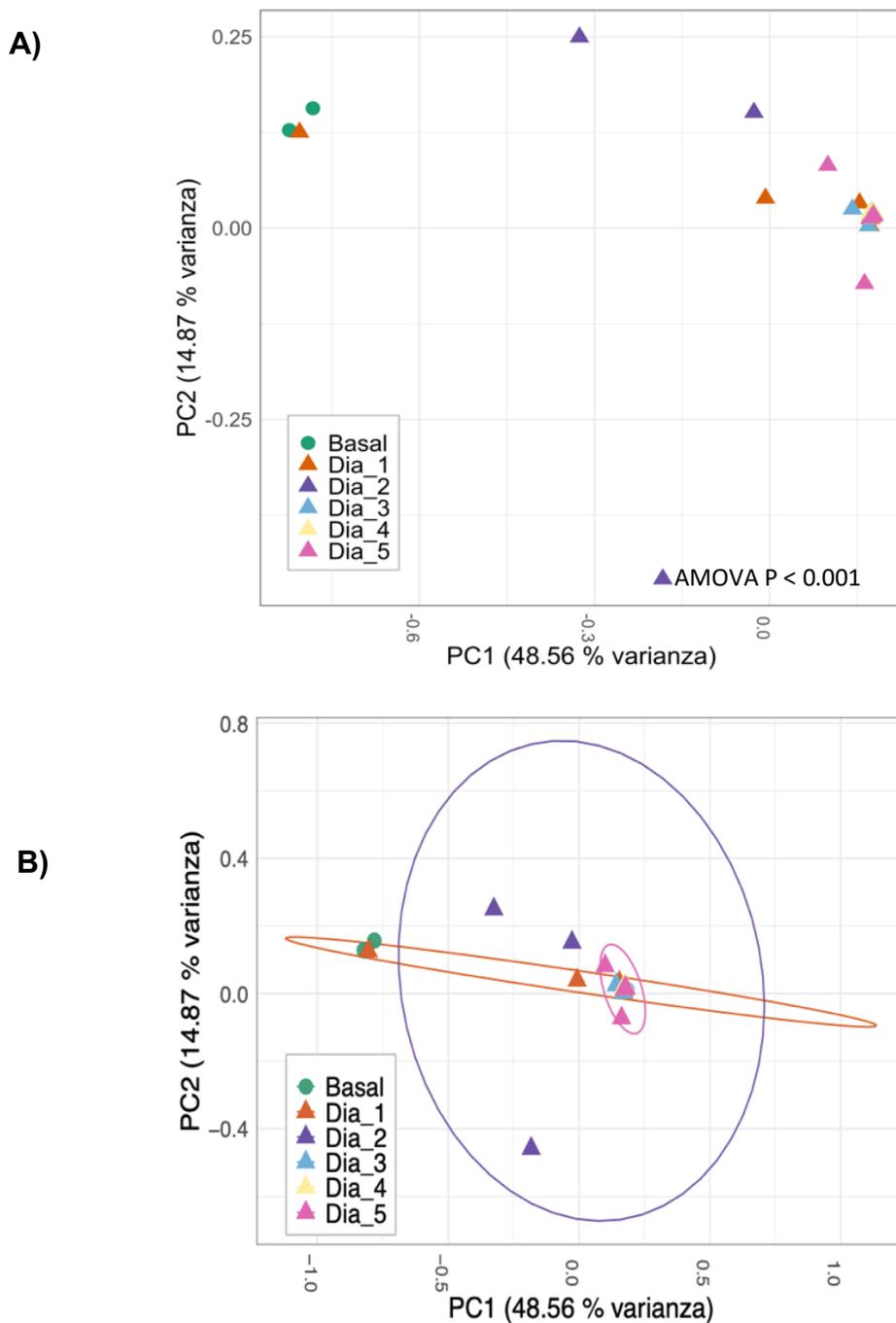


**Gráfico 1. Aumento en diversidad asociados al establecimiento de la periodontitis.** El gráfico corresponde a caja y clavija, la línea dentro de cada caja equivale a la mediana, cada círculo es una muestra y los asteriscos representan la significancia estadística; (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ , sin asterisco  $p > 0.05$ .



**Gráfico 2. Número de unidades operacionales taxonómicas por muestra.** El gráfico corresponde a caja y clavija, la línea dentro de cada caja equivale a la mediana, y cada círculo es una unidad operacional taxonómica.

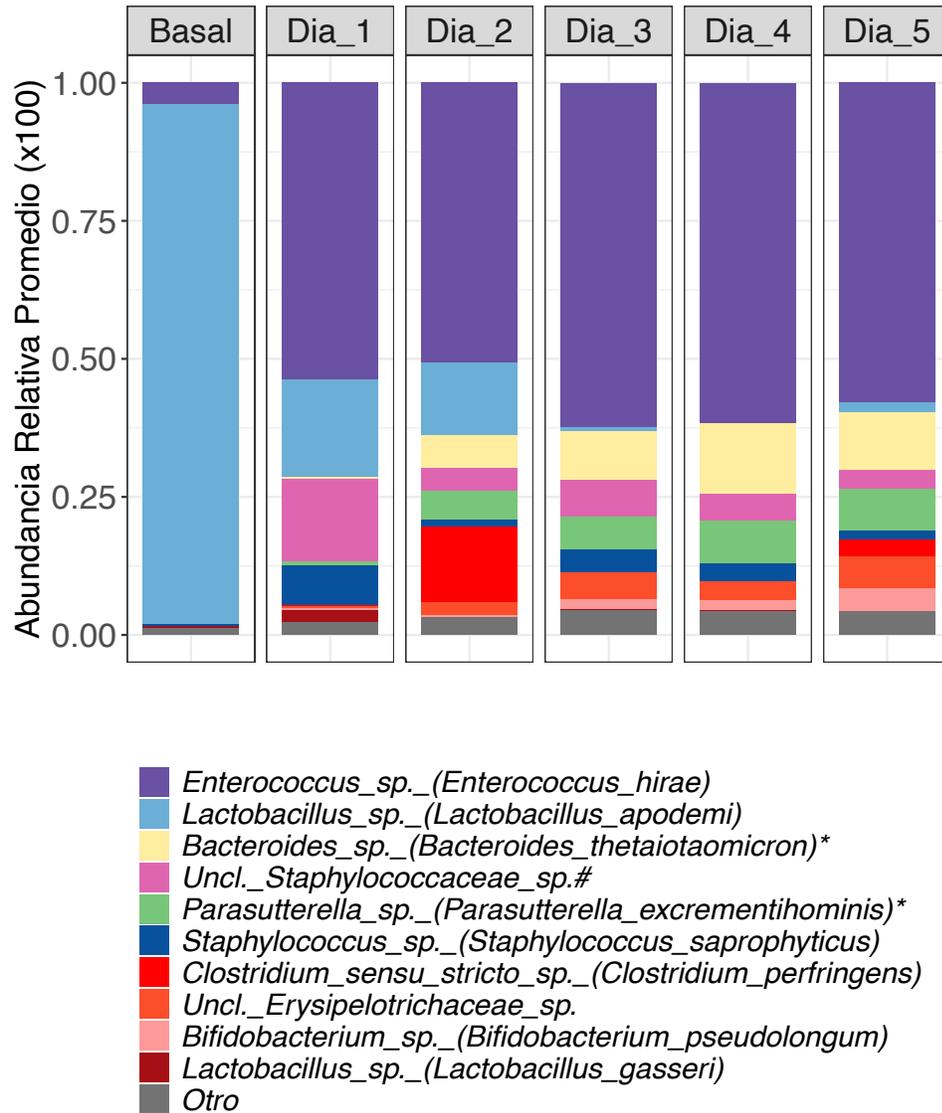
En el gráfico 3, podemos observar un análisis de beta diversidad que compara los parámetros ecológicos entre las distintas comunidades a través de un análisis de coordenadas principales (“Principal Coordinates Analysis (PCoA)”), donde cada figura (círculos y triángulos) representa a cada una de las muestras obtenidas en los diferentes días y nos permite ver como se agrupan las muestras según su estructura. La estructura se define como el análisis en la composición de las comunidades y también la proporción (abundancia relativa) de las especies dentro de la comunidad. Las muestras del estado basal y una muestra del día 1 están agrupadas al lado izquierdo y a medida que pasan los días las muestras se mueven a la derecha del gráfico, las muestras del día 3, 4 y 5 ya tienen al parecer una estructura más homogénea, a medida que la disbiosis va avanzando las comunidades se comienzan a homogenizar. Podemos observar entonces un cambio global en la estructura microbiana basado en las distancias Theta Yue-Clayton asociadas con la ligadura. Para la comparación de la estructura de las comunidades.



**Gráfico 3. Cambios en la estructura asociados al establecimiento de la periodontitis. A)** Análisis de coordenadas principales, cada figura representa a cada una de las muestras en los diferentes días y nos permite ver como se agrupan las muestras según su estructura. **B)** Agrupación de las especies mediante elipses de confianza del 95%.

En el gráfico 4 podemos ver los cambios dramáticos que se producen en la composición microbiana asociados al establecimiento de la periodontitis. En las muestras basales, el perfil de las comunidades está dominada por una o dos especies. Vemos que existe una dominancia muy marcada por parte de *Lactobacillus* sp. y una proporción muy pequeña de *Enterococcus* sp.

Ya a partir del día 1 hay una expansión de *Enterococcus* sp. (*Enterococcus hirae*) que es sostenida en el tiempo hasta el día 5, una disminución importante de *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus apodemi*) siendo muy evidente desde el día 3. A partir del segundo día se aprecia una expansión de las especies de *Bacteroides* sp. (*Bacteroides thetaiotaomicron*), *Parasutterella* sp. (*Parasutterella excrementihominis*) y de *Clostridium* (*Clostridium perfringens*), esto es sostenido hasta el día 5. Entonces vemos que la disbiosis comienza desde el día 1 pero a contar del día 3 al 5 tenemos ya un perfil mucho más establecido. Sin embargo, se debe ir siguiendo en el tiempo para ver su comportamiento. Para la comparación de la abundancia relativa de OTUs, se utilizó el método de LEfSe.



**Gráfico 4. Cambios dramáticos en la composición microbiana asociados al establecimiento de la periodontitis.** Gráfico de barras. Cada barra corresponde a una muestra, en el eje y se puede observar el porcentaje de abundancia que representa a cada especie con respecto al total. Significativamente aumentados determinado por LEfSe; \*día 4 y #día 5.

## 7. DISCUSIÓN

A partir de los hallazgos encontrados aceptamos la hipótesis en donde se establece que existe una disbiosis progresiva del microbioma subgingival caracterizada por el aumento paulatino de bacterias anaerobias a medida que ocurre la pérdida de hueso alveolar durante periodontitis experimental.

De acuerdo a la literatura, la periodontitis es multifactorial, y uno de estos factores se debe al aumento en la carga microbiana; ejemplo de ello es la microbiota presente en el área subgingival (Socransky y Haffajee, 2005, Kornman, 2008), donde se observa un aumento progresivo de la diversidad de especies asociado al establecimiento de la periodontitis. Hay estudios que señalan que la acumulación de bacterias es necesaria para que se produzca inflamación y finalmente la enfermedad cuando existe un hospedero susceptible (Hajishengallis y cols., 2015). Esto se observa en los resultados obtenidos en nuestro estudio, en que observamos un aumento en la diversidad cuando se comparan las muestras del día 1 al día 5 post instalación de la ligadura con la del estado basal. Por lo tanto, la diversidad aumenta conforme van pasando los días. Finalmente, se puede ver una estabilización de la diversidad en el día 4 y día 5 (gráfico 1), cuando ya existe el establecimiento de la periodontitis evidenciada por la pérdida de hueso alveolar (Dutzan y cols. 2018). En estudios realizados por Kirst y cols. podemos ver que las bacterias asociadas a la enfermedad son un componente muy pequeño del microbiota subgingival en la salud y aumentan significativamente con el desarrollo de los sacos periodontales y periodontitis (Kirst y cols, 2015, Riep y cols. 2009). Además, se pueden observar algunos genotipos específicos de especies individuales que muestran una prevalencia diferente en sujetos con salud y enfermedad periodontal (Amano y cols. 2004, Haubek, 2001). Actualmente, se postula que la periodontitis es impulsada por la disbiosis de comunidades polimicrobianas sinérgicas caracterizadas por un crecimiento desequilibrado de un subconjunto de especies comensales (conocidas como patobiontes) en lugar de un solo patógeno o unos pocos patógenos específicos (Díaz y cols., 2016). En estudios realizados por Tsukasaki y cols. en que se monitoreó la cantidad y composición de bacterias orales en salud y enfermedad utilizando el modelo PIL, en donde se

observó que la carga bacteriana total en enfermedad aumentó significativamente en comparación con los ratones del grupo control a los 7 días después de la colocación de la ligadura (Tsukasaki y cols., 2018). Por lo tanto, los cambios disbióticos en las comunidades microbianas, producen un aumento en la carga microbiana total, necesaria para causar la enfermedad. Más aún, la microbiota disbiótica se altera aún más por el aumento de la abundancia de especies asociadas predominantemente a la enfermedad (Van Dyke y cols. 2020).

Otro de los factores asociados con la enfermedad tiene que ver con los cambios en la estructura de las comunidades microbianas, siendo uno de los principales factores relacionados con la progresión de la enfermedad (Tanner y cols. 1979, Tanner y cols 1998), por lo que podemos afirmar que existen cambios estructurales asociados al establecimiento de la periodontitis. Lo anterior se condice con nuestros estudios, pudiéndose observar que existen cambios en la estructura de las comunidades microbianas conforme progresa la enfermedad hacia el establecimiento de la periodontitis, en donde a medida que va progresando la enfermedad y la disbiosis va avanzando, se va observando una estructura mucho más homogénea, como pudimos apreciar en el gráfico 3. En estudios realizados recientemente, se investigó el microbioma local y su relación con la periodontitis en que se examinaron las comunidades microbianas en ratones con periodontitis inducida por ligadura después de dos horas luego de la colocación de la ligadura y a los 5 días después de la inducción de la enfermedad (Dutzan y cols., 2018). En comparación con el grupo control, en enfermedad se presentaron comunidades microbianas con cambios en la abundancia relativa de especies comensales, y alteraciones significativas en la composición y estructura de las comunidades. Se pudo observar, al igual que en nuestros resultados, que existen cambios en la estructura a medida que la enfermedad va progresando hasta la periodontitis. Lo anteriormente mencionado también se puede observar de forma similar en estudios realizados por Tsukasaki y cols, en los que mediante la comparación de análisis de coordenadas principales basados en PERMANOVA (prueba estadística multivariada no paramétrica), entre un grupo de ratones sanos y un grupo de ratones con periodontitis, se observó de igual forma que existe este cambio en la estructura asociada al establecimiento de la enfermedad (Tsukasaki y cols., 2018);

por lo tanto, se asocia con alteraciones en las comunidades microbianas consistentes con disbiosis. Está descrito que el microbioma asociado a la enfermedad periodontal humana se caracteriza por un sobrecrecimiento microbiano y cambios disbióticos en las comunidades bacterianas, con un sobrecrecimiento de bacterias anaerobias fundamentalmente gram-negativo (Griffen y cols., 2012; Abusleme y cols., 2013).

La estructura de las comunidades tiene que ver con la sensibilidad al oxígeno que poseen las bacterias orales. Esto varía ampliamente dependiendo si se encuentra en salud o enfermedad (Socransky y Haffajee, 2005). En enfermedad existen bastantes especies anaerobias obligados en la boca (en salud también pero en menor proporción). De igual forma en enfermedad existe en gran parte un sobrecrecimiento de bacterias con mayor potencial patogénico, inflamación persistente y a la formación de sacos periodontales que cambia el ambiente de crecimiento bacteriano (Marsh, 2003). Las comunidades microbianas asociadas a salud periodontal son dominadas por bacterias Gram positivo facultativas como *Streptococcus* spp., *Rothia* spp. y *Actinomyces* spp. (Trombelli y cols. 2013). En nuestros estudios podemos ver algo similar, donde en las muestras basales, el perfil de las comunidades está dominado por una o dos especies (gráfico 4), evidenciando una dominancia muy marcada por parte de *Lactobacillus* sp. y una proporción muy pequeña de *Enterococcus* sp.. Esto lo podemos comparar con estudios realizados en ratones, donde en muestras de ratones sanos (2 horas previas a la colocación de la ligadura), hay una dominancia muy marcada por *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp. (*S. danieliae*) y una muy baja proporción de *Enterococcus* sp. (Dutzan y cols., 2018). Las bacterias asociadas a salud (muestra basal) son un componente muy grande en relación a las muestras asociadas a enfermedad, en donde la microbiota subgingival asociada a salud disminuye significativamente conforme van pasando los días y va progresando la enfermedad. Hay una disminución importante de *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus apodemi*) siendo muy evidente desde el día 3. A partir del segundo día, se aprecia una expansión de las especies de *Bacteroides* sp. (*Bacteroides thetaiotaomicron*), *Parasutterella* sp. (*Parasutterella excrementihominis*) y de *Clostridium* sp. (*Clostridium perfringens*), esto es sostenido hasta el día 5. Por lo que podemos ver

cambios dramáticos en la composición microbiana asociados al establecimiento de la periodontitis. En estudios realizados por Dutzan y cols. podemos observar de igual forma una disminución de *Lactobacillus* sp. muy marcada a partir del primer día después de la colocación de la ligadura. En nuestros resultados, a partir del día 2 ya se observa la aparición de *Bacteroidetes* spp., *Firmicutes* spp., *Bifidobacterium* sp. y *Pseudomonas* sp. (*P. aeruginosa*). A partir del día 3, se observa un aumento importante de *Clostridium XVIII* sp. Es importante mencionar que desde el día 1 y conforme va progresando la enfermedad, se observó una dominancia muy marcada de *Enterococcus* sp., en coincidencia con lo reportado por Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018). Al observar la composición bacteriana oral en estudios realizados en ratones con el modelo PIL realizados por Tsukasaki y cols., reveló que la composición de las bacterias orales se alteró significativamente al comparar el grupo de ratones sanos y ratones con periodontitis (Tsukasaki y cols. 2018), de forma muy similar a lo señalado anteriormente comparados hasta el día 7. Además, en estudios en que se analizaron los microbiomas orales e intestinales en ratones utilizando el modelo PIL (Kitamoto y cols. 2020) se demuestra que la periodontitis resultó en una disbiosis oral, donde las enterobacterias en particular dominaron durante la enfermedad, se observó que las *Enterobacteriaceae* fue el taxón bacteriano más abundante en la cavidad oral durante la periodontitis; y *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. fueron las especies más dominantes en la cavidad bucal inflamada; por lo tanto, estos resultados demuestran que es necesario que se produzca la disbiosis para la enfermedad, sin embargo, se diferencia de nuestros estudios debido a que el taxón predominante fue *Enterococcus* sp.

Es importante mencionar la influencia que tiene la periodontitis con otras manifestaciones sistémicas ya que existe bastante evidencia de que la cavidad oral está conectada microbiológica e inmunológicamente con diferentes partes de nuestro cuerpo. Lo anterior tiene gran relevancia clínica ya que al saber cómo evoluciona esta disbiosis, posteriormente podremos saber cómo abordar la enfermedad e inhibirla, reduciendo así las diferentes enfermedades sistémicas que se mencionarán a continuación. Como ya hemos mencionado, la disbiosis microbiana oral está relacionada con la inflamación oral, y esta desencadena la enfermedad periodontal (Hajishengallis y cols., 2014) y puede contribuir a las

condiciones sistémicas a través de la bacteriemia. Dentro de las condiciones patológicas sistémicas podemos encontrar enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, resultados adversos del embarazo, diabetes e incluso intestino irritable (Tsukasaki y cols., 2018, Kitamoto y cols., 2020). Se ha sugerido que las bacterias orales ingresan a la circulación sistémica a través de la encía inflamada y afectan directamente a otros órganos (Han y cols., 2013). En experimentos realizados por Tsukasaki y cols. mediante PIL en ratones analizaron hígados, bazo y tejidos periodontales después de 42 días de inducción de la periodontitis, detectándose la formación de colonias bacterianas en un cultivo de células del hígado y el bazo después de la colocación persistente de una ligadura alrededor del diente. Las especies bacterianas detectadas en el hígado y el bazo también se encontraron en la cavidad bucal (Tsukasaki y cols., 2018), lo que indica la existencia de una diseminación sistémica de las bacterias orales. Existen estudios en donde se ha informado que la inflamación periodontal exacerba la inflamación intestinal *in vivo*, debido a que la periodontitis conduce a la expansión de los patobiontes orales, incluidas las especies de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*, las cuales son bacterias típicas de la cavidad bucal (Kitamoto y cols., 2020). Esto tiene que ver con la disbiosis producida durante el transcurso de la enfermedad periodontal.

Una de las enfermedades crónicas relevantes y más comunes dentro de las mencionadas anteriormente se encuentra la Diabetes mellitus ya que está relacionada con un entorno inflamatorio crónico que incluye la inflamación periodontal y la pérdida de masa ósea (Lalla y Papapanou, 2011). Existen estudios que demuestran que esta enfermedad aumenta la inflamación de los tejidos periodontales y la pérdida de hueso alveolar en ausencia de infección exógena (Xiao y cols., 2017), incluso esta misma investigación demostró que la diabetes aumenta la patogenicidad de la microbiota oral en donde aumentan los niveles de bacterias pertenecientes a los phyla Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*) y Firmicutes (*Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Aerococcus*), microorganismos que están asociados con procesos disbióticos como la periodontitis en el modelo de PIL; por lo que la diabetes podría disminuir la diversidad microbiana oral y potencialmente aumentar la susceptibilidad de la formación de un microbioma con un mayor potencial patogénico. Además, es importante señalar que, con el modelo

de periodontitis inducido por ligadura, sin la necesidad de agregar otro tipo de organismos, es suficiente para inducir una pérdida ósea periodontal significativa en modelos de roedores (Graves y cols., 2008, Hajishengallis y cols., 2015). Incluso, se ha demostrado que el diagnóstico de periodontitis se acompaña de un cambio en la estructura y composición de la comunidad bacteriana (Abusleme et al., 2013; Griffen y cols., 2012).

Por lo tanto, un cuidado oral óptimo, como un buen cepillado dental para la eliminación de la placa bacteriana, tendrá como consecuencia la reducción de la inflamación periodontal evitando así la evolución de la enfermedad reduciendo el riesgo de sufrir diferentes enfermedades sistémicas. Si bien en nuestro estudio no son exactamente los mismos microorganismos que se encuentran en el ser humano porque se investigó en otra especie, si son equivalentes. Es importante caracterizar de forma correcta este tipo de modelos para que después las extrapolaciones que se hagan a futuro nos permitan entender la transición desde salud hacia enfermedad.

Aunque los modelos animales han proporcionado una amplia gama de datos importantes, a veces es difícil determinar si los hallazgos son aplicables a los humanos. Además, la variabilidad en las respuestas del hospedero a la infección bacteriana entre los individuos contribuye significativamente a la expresión de enfermedades periodontales. Todavía no se ha desarrollado un modelo práctico y altamente reproducible que realmente imite la patogénesis natural de la enfermedad periodontal humana. Además, la variabilidad de los resultados encontrados en la literatura con respecto a este modelo obstaculiza una conclusión definitiva sobre las verdaderas características (iniciación y progresión) de la enfermedad (Nogueira y cols. 2014).

Este trabajo tenía por objetivo caracterizar secuencialmente los cambios que ocurren en el microbioma subgingival durante periodontitis experimental. Nosotros podemos ver una expansión de especies bacterianas anaerobias, evidenciando un cambio en las proporciones de los distintos tipos de organismos donde las comunidades microbianas se vuelven más complejas.

Finalmente, se necesitan estudios futuros con un tiempo de observación más largo para ver si la disbiosis que se presenta al quinto día se mantiene o cambia. Sabemos que luego de la acumulación de placa bacteriana se empieza a producir inflamación y luego reabsorción, los tejidos periodontales se retraen y se alejan de la ligadura, por lo tanto, el uso prolongado de la ligadura no sería lo ideal, ya que se ha visto que un buen tiempo de medición podría ser hasta el día 14, porque luego de este día aumenta en exceso la inflamación lo que podría dañar la ligadura y se podría perder información relevante.

## 8. CONCLUSIONES

1. Gracias al modelo de periodontitis inducida por ligadura y la extracción de ADN y secuenciación basada en el gen 16S rDNA se pudo evaluar el aumento en la diversidad, los cambios en la estructura y composición de las especies bacterianas del microbioma subgingival durante la periodontitis experimental.
2. Se observó un aumento en la diversidad y cambios en la estructura asociados al establecimiento de la periodontitis, además, se observaron cambios dramáticos que se producen en la composición microbiana asociados al establecimiento de la periodontitis.
3. Existió un aumento significativo en la diversidad de microbiomas 24 horas después de la colocación de la ligadura, y se mantuvo durante todo el periodo de observación y de magnitud similar hasta el día 5.
4. Tras la ligadura, se observó una marcada reducción de un *Lactobacillus sp.* seguido de un aumento en *Enterococcus sp.*, convirtiéndose en los taxones más abundantes. Este cambio fue acompañado por una sobrerrepresentación de *Bacteroides sp.*, y *Parasuterella sp.* después de la colocación de la ligadura.
5. Al comparar las muestras según su estructura, se pudo observar que la muestra basal y la del día 1 estuvieron agrupadas, y las otras muestras (día 3, 4 y 5) también estaban grupadas, esto ocurre debido a que tienen una estructura más homogénea. Por lo tanto, a medida que la disbiosis va avanzando, las especies se comienzan a homogeneizar. Podemos observar entonces un cambio global en la estructura microbiana basado en las distancias Theta Yue-Clayton asociadas con la ligadura.
6. Podemos definir que existen cambios tempranos y sostenidos que caracterizan la disbiosis microbiana durante la periodontitis.
7. Debido a que las comunidades disbióticas están relacionadas con periodontitis, nuestros estudios sugieren que la respuesta inflamatoria temprana puede ser el principal modulador de la disbiosis microbiana en este modelo.

8. Es práctico analizar la diversidad, cambios en la estructura y abundancia relativa del microbioma subgingival junto con los cambios globales en las comunidades microbianas, debido a que son importantes para la inducción de la enfermedad. La evaluación de las comunidades microbianas se realizó durante el establecimiento de la enfermedad, lo que permite la identificación de la misma.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas J, Paster BJ, Stokes I, Olsen I. (2005). Dewhirst Fe. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*; 43:5721–32.
- Abe T, Hosur KB, Hajishengallis E, Reis ES, Ricklin D y cols. (2012). Local complement-targeted intervention in periodontitis: proof of concept using a C5a receptor (CD88) antagonist. *J. Immunol.* 189, 5442.
- Abe T, Hajishengallis G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods* 394, 49-54. doi: 10.1016/j.jim.2013.05.002.
- Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 7, 1016-1025. doi:10.1038/ismej.2012.174.
- Abusleme L, Hong BY, Dupuy AK, Strausbaugh LD, Diaz PI. (2014). Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *J Oral Microbiol* 6. doi:10.3402/jom.v 6.23990.
- Alayan J, Ivanovski S, Farah CS. (2007). Alveolar bone loss in T helper 1/T helper 2 cytokine-deficient mice. *Journal of Periodontal Research*, vol. 42, no. 2, pp. 97–103.
- Amann R, Ludwig W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev*; 24:555–565.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. (2004). Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*; 39:136–142.
- Anbinder AL, Moraes RM, Lima GM, Oliveira FE, Campos DR y cols. (2016). Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy induced bone loss in mice. *Bone*, 83, 241–247.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. (1998). IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*;160(1):403-409.

Bartold P, Van Dyke T. (2013). Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000.*;62:203-217.

Bartold PM, Van Dyke T. (2017). Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000.*;75:317-329.

Belkaid Y, Hand TW. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157, 121-141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.

Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA y cols. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol.* 71, 1009.

Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM. (1996). Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed culture oral biofilms. *Microbiology*;142(Pt 3):623–9.

Buset SL, Walter C, Friedmann A, Weiger R, Borgnakke WS y cols. (2016). Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. *J Clin Periodontol* 43, 333-344. doi:10.1111/jcpe.12517.

Cai X, Li C, Du G, Cao Z. (2008). Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, vol. 43, no. 1, pp. 14–2.

Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS y cols. (2016). Obesity and hyperlipidemia modulate alveolar bone loss in Wistar rats. *Journal of Periodontology*, 87(2), e9–e17.

Chapple IL. (2014). Time to take periodontitis seriously. *BMJ* 348, g2645. doi:10.1136/bmj.g 2645.

Christensen H, Nordentoft S, Olsen JE. (1998). Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*;48(part 2):605– 610.

Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R y cols. (2009). Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol*; 80:1421–1432.

Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. (1998). Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.*;66(4):1660-1665.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC y cols. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*; 192:5002–17.

Diaz PI, Hoare A, Hong BY. (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc* 44, 421-435.

Dutzan N, Kajikawa T, Abusleme L, Greenwell-Wild T, Zuazo C y cols. (2018). A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans.

Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA. (2016). Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol 2000.*;72:54-75.

Eke PI, Thornton-Evans G, Dye B, Genco R. (2012). Advances in surveillance of periodontitis: the centers for disease control and prevention periodontal disease surveillance project, *J. Periodontol.* 83 1337e1342.

Erturk-Hasdemir D, Kasper DL. (2013). Resident commensals shaping immunity. *Curr Opin Immunol* 25, 450-455. doi: 10.1016/j.coi.2013.06.001.

Eskan MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar, J, Lim JH y cols. (2012). The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* 13, 465-473. doi:10.1038/ni.2260.

Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzua I y cols. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol* 81, 1403-1410. doi:10.1902/jop.2010.100148.

- Giovannoni S, Britschgi T, Moyer C, Field K. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*; 345:60–3.
- Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, 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.
- Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C. (2012). Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Frontiers of Oral Biology*, 15, 117–132.
- Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS y cols. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* 6, 1176-1185. doi:10.1038/ismej.2011.191.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews Microbiology*. 10(10):717-725.
- Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol* 29, 248-257. doi:10.1111/omi.12065
- Han YW, Wang X. (2013). Mobile Microbiome: oral bacteria in extraoral infections and inflammation, *J. Dent. Res.* 92 485e491.
- Huang S, Li R, Zeng X, He T, Zhao H y cols. (2014). Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota, *ISME J* 8, 1768–1780.
- Helieh S, Puleo A. (2011). Animal Models for Periodontal Disease *Review. Article*, Article ID 754857, 8 pages doi:10.1155/754857
- Hernandez M, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega A y cols. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res* 90, 1164-1170. doi:10.1177/0022034511401405.
- Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH y cols. (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*; 87:1016–1020.

- Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, Havarstein LS, Bek-Thomsen M y cols. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. PLoS One; 3: e2683.
- Kinane, DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. (2017). Periodontal diseases. Nat Rev Dis Primers 3, 17038. doi:10.1038/nrdp.2017.38.
- Kirst ME, Li EC, Alfant B, Chi YY, 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.
- Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Jiao Y, Gilliland, Hayashi A y Cols. (2020). The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis, Cells. doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.048
- Kolenbrander PE, London J. (1998). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.*;175(11):3247-3252.
- Kornman KS. (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 79, 1560-1568. doi:10.1902/jop.2008.080213.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79, 5112-5120. doi:10.1128/AEM.01043-13.
- Lalla E, Papapanou PN. (2011). Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol* 7, 738-748. doi:10.1038/nrendo.2011.106.
- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. (2018). The oral microbiota: Dynamic communities and host interactions. *Nature reviews Microbiology*. 16(12):745-759.
- Li CH, Amar S. (2007). Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J. Periodontol.* 78, 1120.

- Listgarten MA. (2000). The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000; 5:52–65.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. (1965). Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 36, 177-187. doi:10.1902/jop.1965.36.3.177.
- Marchesan J, Ginary MS, Jing L, Miao MZ, Zhang S y cols. (2018). An experimental murine model to study periodontitis. *Nat. Protoc.* 13, 2247–2267. doi: 10.1038/s41596-018-0035-4
- Marsh PD. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research.* 8(2):263-271.
- Marsh PD. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*;8(2):263-271.
- Marsh PD. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149, 279-294. doi:10.1099/mic.0.26082-0.
- Meyle J, Chapplel. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis, *Periodontol.* 2000 69 7e17.
- Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. (2017). Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol.*;18:S23-S38.
- Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S. (2015). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J Gastroenterol.*;50(2):167-179.
- Mizuno M, Miyazawa K, Tabuchi M, Tanaka M, Yoshizako M y cols. (2015). Reveromycin a administration prevents alveolar bone loss in Osteoprotegerin knockout mice with periodontal disease. *Scientific Reports*, 5, 16510.
- Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA. (2014). Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *Journal of Periodontology*, 85(3), 465–477.

Moore LV, Moore WE, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA y cols. (1987). Bacteriology of human gingivitis. *J Dent res*; 66:989–95.

Nogueira AV, de Souza JA, de Molon RS, Pereira Eda S, de Aquino SG y cols. (2014). HMGB1 localization during experimental periodontitis. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–10.

Pace NR, Olsen GJ, Woese CR. (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*; 45:325–6.

Paju S, Scannapieco FA. (2007). Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections, *Oral Dis*. 13 508e512.

Reynolds MA. (2014). Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000* 64, 7-19. doi:10.1111/prd.12047

Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B y cols. (2009). Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol*. 47(6):1705-1711.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75,7537-7541. doi:10.1128/AEM.01541-09.

Schloss PD. (2010). The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol*;6: e1000844.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L y cols. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12, R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.

Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J y cols. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci* 23, 329-355. doi:10.1590/1678-775720140259.

- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*; 25:134–144.
- Socransky SS, Haffajee AD. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38, 135-187. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x.
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*;6: 278–307.
- Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*; 25:85–98.
- Tonetti MS, 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. *J Clin Periodontol* 44, 456-462. doi:10.1111/jcpe.12732.
- Trombelli L, Farina R. (2013). Are view of factors influencing the incidence and severity of plaque-induced gingivitis. *Minerva Stomatol*; 62:207–34.
- Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W y cols. (2018). Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat. Commun.* 9, 701.
- Tsute C, Floyd E, Escapa I, Yanmei Huang, Katherin P. (2021). Human Oral Microbiome Database. <http://www.homd.org/index.php>.
- Van Dyke TE. (2007). Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontol 2000*; 45:10-13.
- Van Dyke TE, Kornman KS. (2008). Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol*; 79:1503-1507.
- Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. (2020). The Nexus between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Front. Immunol.* 11:511. doi:10.3389/fimmu.2020.00511

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73, 5261-5267. doi:10.1128/AEM.00062-07.

Ward D, Weller R, Bateson M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*; 345:63–5.

Winter SE, Baumler AJ. (2014). Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut Microbes* 5, 71-73. doi:10.4161/gmic.27129.

Xiao E, Mattos M, Henrique G, Chen S, Dias J y cols. (2017). Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell Host, Microbe* 22, 120–128.

Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC. (2007). “An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals,” *Blood*, vol. 109, no. 9, pp. 3794– 3802.

Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. (2009). Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMc Microbiol*; 9:259–71.

Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJ. (2014). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol*; 4:85.

## 10. ANEXOS Y APÉNDICES

### Anexo 1: Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11180505.



N° 018/FONDECYT/518

Programa  
Fondecyt

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