

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL DE SITIOS CON Y SIN SANGRADO AL SONDAJE EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA

Loreto Andrea Abusleme Ramos

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Nora Silva Steffens**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dra. Patricia Díaz Moreno***

Prof. Dr. Jorge Gamonal Aravena

** University of Connecticut Health Center*

**Financiamiento:
Proyecto FONDECYT 1090046 y NIH/NIDCR-RO1DE02157801.**

**Santiago - Chile
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL DE SITIOS CON Y SIN SANGRADO AL SONDAJE EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA

Loreto Andrea Abusleme Ramos

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Nora Silva Steffens**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dra. Patricia Díaz Moreno***

Prof. Dr. Jorge Gamonal Aravena

** University of Connecticut Health Center*

**Financiamiento:
Proyecto FONDECYT 1090046 y NIH/NIDCR-RO1DE02157801.**

**Santiago - Chile
2012**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el(a) candidato(a)

Loreto Andrea Abusleme Ramos

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Periodontología en examen rendido el 27 de Enero de 2012.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Rodrigo Hidalgo

Prof. Patricia Pozo

Prof. Dr. Adolfo Contreras

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a los proyectos FONDECYT 1090046 y al NIH/NIDCR-RO1DE02157801, por el financiamiento otorgado para poder concretar este trabajo de investigación. Me gustaría aprovechar esta ocasión para manifestar mi más sincera gratitud a mis tutores, el desarrollo de esta tesis no habría sido posible sin su guía, entrega y la confianza que han depositado en mí para llevar a cabo este proyecto. Desde hace ya un tiempo, la Prof. Nora Silva y el Prof. Dr. Jorge Gamonal, han sido parte central en la motivación para participar en actividades de investigación y en ir cimentando la ruta a seguir en la academia al interior de nuestra Facultad. Asimismo, agradezco especialmente a la Prof. Dra. Patricia Díaz, por abrirme las puertas de su Laboratorio y acompañarme a lo largo de todo este desafío, además de continuar contribuyendo a mi formación y mostrarme nuevos caminos a seguir. También me gustaría aprovechar esta oportunidad para agradecerle a los revisores de esta tesis, quienes contribuyeron a mejorar de forma importante este trabajo.

Por otra parte, quisiera agradecer a mi familia por apoyarme en todo momento, especialmente durante el transcurso de este Magíster, por el afecto y ayuda brindada en esta tarea. Además, me gustaría poder plasmar aquí también mi gratitud a Nicolás, por alentarme constantemente a seguir adelante,

por los consejos, la paciencia y serenidad que me transmitió a lo largo de todo este proceso. Muchas gracias a todos aquellos que me han apoyado de distintas maneras, con su interés y preocupación, a mis queridos amigos de siempre, a mis colegas de Microbiología (en especial a Denisse Bravo y Leyla Gómez), a Leslie Henríquez y Carolina Ferrer, quienes se caracterizaron por su excelente disposición en todo momento.

Índice

| | |
|--|------------|
| Introducción..... | 1 |
| Aspectos teóricos..... | 3 |
| Hipótesis..... | 26 |
| Objetivos..... | 27 |
| Materiales y métodos..... | 28 |
| Resultados..... | 45 |
| Discusión..... | 70 |
| Conclusiones..... | 84 |
| Sugerencias..... | 87 |
| Resumen..... | 88 |
| Referencias Bibliográficas..... | 90 |
| Anexo nº 1..... | 102 |
| Anexo nº 2..... | 103 |

Introducción

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa ocasionada por cambios a nivel del biofilm subgingival y la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero, destruyendo los tejidos de soporte del diente (Armitage, 1995). El biofilm subgingival esta compuesto de comunidades microbianas complejas, las cuáles hasta la fecha, no han sido analizadas con técnicas que las caractericen en su totalidad. En este contexto, las nuevas tecnologías de secuenciación, como el *high-throughput pyrosequencing*, adquieren gran relevancia, con el fin de comprender mejor la diversidad e interrelaciones al interior del microbioma subgingival (Margulies et al., 2005). Por otra parte, se ha descrito que los signos clínicos a nivel del saco periodontal, pueden estar influyendo la composición de las comunidades microbianas a este nivel (Socransky and Haffajee, 2005). Dentro de ellos, el sangrado al sondaje (BOP) destaca como el signo clínico que refleja más fielmente la inflamación en los tejidos periodontales (Greenstein et al., 1981 ; Offenbacher, 2007). La relación del BOP con la composición de la microbiota ha tratado de ser caracterizada otros autores (Armitage, 1982 ;Baab, 1986; Socransky, 1991), pero generalmente su influencia no ha sido debidamente aislada como factor a estudiar, por lo cual no se ha podido obtener conclusiones más precisas. Además, estos trabajos han utilizado metodologías que se centran en algunos microorganismos específicos sin abordar el

microbioma en toda su complejidad. Debido a lo anterior, el propósito de este estudio, fue determinar la influencia del BOP en la composición y cantidad del microbioma subgingival, utilizando como técnica principal 454- *high throughput pyrosequencing*.

Aspectos teóricos

Generalidades de la periodontitis crónica

La periodontitis crónica es una enfermedad compleja que en su expresión involucra la interacción del biofilm subgingival con la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero y las subsecuentes alteraciones en la homeostasis del tejido conectivo y del hueso alveolar (Kornman, 2008). Esta patología es reconocida como la forma más común de periodontitis, pudiendo iniciarse a cualquier edad, pero siendo más frecuentemente detectada en pacientes adultos (1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999, 1999).

Algunos estudios han descrito que en varios lugares del mundo la prevalencia de la periodontitis crónica ha mostrado una tendencia al descenso (Borrell et al., 2005; Demmer and Papapanou; Hugoson and Norderyd, 2008). Sin embargo, la periodontitis crónica es aún un problema de salud de importancia, del cual algunos investigadores señalan que su prevalencia ha sido subestimada, específicamente en el caso de Estados Unidos, debido a los

protocolos utilizados en la NHANES (*Nacional Health and Nutrition Examination Survey*) (Eke et al., 2010).

Según diversos estudios epidemiológicos, la prevalencia de la periodontitis severa en pacientes adultos es variada, en Canadá es del 22%, en Francia del 20%, llega al 50% en una cohorte en Brasil, en Alemania al 21%, en una población de USA al 32% y en Australia asciende apenas al 4% (Demmer and Papapanou, 2010). Estas diferencias en la prevalencia pueden deberse a las características de la población examinada, aunque también es claro que la diversidad de definiciones de caso utilizadas para “periodontitis” en los distintos estudios afectan las mediciones de prevalencia (Savage et al., 2009) . En Chile, un estudio epidemiológico reciente de Gamonal y cols., estableció que un tercio de la población de adultos jóvenes (35 a 44 años) y dos tercios de en los adultos mayores (65 a 74 años) presenta al menos un sitio con una pérdida del nivel de inserción clínica mayor o igual a 6 mm. Debido a lo anterior, se desprende que la periodontitis constituye un problema de salud importante en nuestro país (Gamonal et al., 2010).

La periodontitis desde un punto de vista patológico, se caracteriza por la presencia de inflamación gingival en los sitios periodontales afectados, seguido de una desinserción de las fibras colágenas del cemento y una migración apical del epitelio de unión. Además, los eventos inflamatorios junto con la pérdida del

tejido conectivo de inserción, conducen a la reabsorción de la porción coronal del hueso de soporte alveolar (Armitage, 1995). Para efectuar el diagnóstico de esta enfermedad, junto con la inspección visual de los tejidos gingivales, se han utilizado una serie de mediciones clínicas, tales como la profundidad al sondaje (PD), la medición del nivel de inserción clínica (CAL) y el sangrado al sondaje (BOP)(Savage et al., 2009).

Etiología de la periodontitis crónica

La periodontitis crónica resulta de la interacción entre los mecanismos defensivos del hospedero y comunidades microbianas complejas a nivel del biofilm subgingival (Socransky and Haffajee, 2005); este último puede contener hasta un número estimado de 500 especies bacterianas (Aas et al., 2005). Por muchos años, el biofilm subgingival fue estudiado fundamentalmente utilizando cultivo microbiológico clásico, identificando a las distintas especies de acuerdo a sus características fenotípicas. Destacan entre los estudios realizados con esta metodología los trabajos clásicos de Moore & Moore (Moore and Moore, 1994), en los cuales examinaron la composición de la microbiota subgingival en salud y en distintas condiciones de enfermedad periodontal, llegando a obtener 17,000 aislados provenientes de más de 600 pacientes, lo cual (junto a otras investigaciones), contribuyó notablemente al conocimiento del biofilm subgingival (Socransky and Haffajee, 2005). La utilización de las técnicas de

cultivo, ha posibilitado la identificación de nuevas especies y ha permitido contar con dichos microorganismos viables para caracterizar su interacción con los tejidos periodontales. Sin embargo, el cultivo microbiológico presenta limitaciones importantes, que han hecho evidente la necesidad de disponer de nuevos métodos de caracterización de la diversidad del microbioma subgingival. Al respecto, un claro ejemplo de estas limitaciones fue la subestimación de la participación de espiroquetas en las enfermedades periodontales, debido a la gran dificultad que existe para cultivarlas (Asai et al., 2002). El advenimiento de técnicas moleculares ha ayudado a superar este tipo de obstáculos, contribuyendo a una mejor comprensión del microbioma subgingival. Incorporando este tipo de metodologías, Socransky y cols. analizaron la presencia y niveles de 40 especies bacterianas utilizando la técnica del checkerboard DNA-DNA hybridization, aportando conocimientos fundamentales de la organización de estas especies al interior del biofilm subgingival y su relación con salud periodontal. Estos autores observaron, en repetidas ocasiones, que la mayoría de estos microorganismos se podían agrupar en 5 “clusters” o complejos (Socransky et al., 1998). Entre ellos, el “Complejo Rojo”, compuesto por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, ha sido el más frecuentemente asociado a periodontitis crónica (Byrne et al., 2009; Socransky et al., 2002; Ximenez-Fyvie et al., 2000). Varios

estudios han confirmado esta asociación, basándose en técnicas de cultivo microbiológico clásico, que seleccionan microorganismos con requerimientos específicos de crecimiento y en métodos moleculares orientados al análisis de especies previamente escogidas. Cabe destacar que los complejos descritos por Socransky y cols. sólo nos dan cuenta de cómo se agrupan y asocian con enfermedad las 40 especies estudiadas, por lo que resulta interesante continuar este análisis y caracterizar cuál sería la distribución de la totalidad de las especies dentro del biofilm subgingival. Por lo tanto, dichas aproximaciones son insuficientes para el estudio exhaustivo de este complejo ecosistema, siendo fundamental utilizar metodologías que permitan caracterizar cambios en el “microbioma subgingival” y así entender el funcionamiento ecológico de estas comunidades (Shchipkova et al., 2010).

El Microbioma Oral Humano

El término microbioma fue acuñado por J. Lederberg, y se refiere a la comunidad ecológica o comensal, simbiótica y microorganismos patogénicos que literalmente comparten en el espacio de nuestro organismo y han sido ignorados como determinantes de salud y enfermedad. En la actualidad, la determinación de las características del microbioma humano es de gran interés

y se están realizando grandes esfuerzos internacionales para su estudio, siendo el National Institutes of Health Human Microbiome Project (HMP), el mayor contribuyente a esta iniciativa (Chen et al., 2010a). El objetivo de HMP es caracterizar la totalidad de los microorganismos y sus genomas, además de las interacciones ambientales en ecosistemas definidos, como el tracto gastrointestinal, piel, tracto genitourinario distal y la cavidad oral (Parahitiyawa et al., 2010).

El microbioma oral ha sido la microbiota humana más estudiada, debido a que se pueden obtener muestras fácilmente y se encuentra fuertemente asociada con enfermedades orales infecciosas como la caries y la periodontitis (Chen et al., 2010a). El estudio del microbioma oral se ha sustentado fundamentalmente en métodos moleculares independientes del cultivo microbiológico, basados en la secuenciación de genes de la subunidad ribosomal 16S (16S rRNA) (Paster and Dewhirst, 2009). Estas técnicas tienen como punto de partida la extracción de DNA genómico de muestras clínicas y continúan con la amplificación de genes de la 16S rRNA, utilizando primers que son complementarios a regiones conservadas en la 16S rRNA. Cuando el DNA genómico es amplificado con esos primers “universales”, los amplicones que se obtienen corresponden a los genes de la 16S rRNA de un gran número de especies. La identificación de éstos últimos puede realizarse por dos vías

principales, la primera y mayormente utilizada, es el clonamiento de los productos de PCR en un vector bacteriano seguido del análisis vía secuenciamiento Sanger de los plásmidos que portan los genes de la 16S rRNA en cada clon. La secuencia que se obtiene de cada clon es luego comparada con una base de datos para así identificar el microorganismo del que se origina la secuencia. La segunda ruta para el secuenciamiento de los amplicones, llamada “pyrosequencing” es un método reciente que analiza directamente los productos resultantes de PCR sin necesidad de clonación (Margulies et al., 2005). Esta tecnología, fundamentalmente la de nueva generación o “high-throughput pyrosequencing”, ha sido de gran utilidad porque ha obviado la necesidad de clonar permitiendo la obtención de gran cantidad de secuencias de forma mucho más rápida y económica que con las técnicas tradicionales (Pallen et al., 2010; Paster and Dewhirst, 2009). Dentro de las características de esta metodología se encuentra el uso de MIDs (multiplex identification tags), que son secuencias específicas para cada muestra que permiten individualizarlas y tener la posibilidad de combinar varias muestras en un mismo experimento, por lo que se consideran métodos de secuenciación masiva en paralelo (*massively parallel sequencing technologies*) (Gabriel et al., 2009). La principal ventaja del uso de MIDs, es que permiten realizar mayor cantidad de

análisis en menos tiempo y reduciendo también el costo (Bentley et al., 2009; Lank et al., 2010).

Otra de las grandes ventajas de esta nueva tecnología para el estudio del microbioma, es que permite el uso de parámetros de estudio utilizados en macroecología, lo cual es esencial para comprender el funcionamiento y caracterizar las comunidades microbianas (Bik et al., 2010). Estos análisis se basan en medidas que reflejan la diversidad, las cuales históricamente se han fundamentado en la especie como unidad de observación. La diversidad al interior de una comunidad dada se denomina “ α – diversidad”, la cual es usualmente caracterizada usando el número total de especies (concepto conocido como “riqueza”) y la abundancia relativa de estas (concepto conocido como “evenness” o “uniformidad”) y/o a través de índices que combinan estas dos dimensiones. Del mismo modo, la diversidad entre comunidades se denomina “ β – diversidad” y generalmente se utiliza el número de especies compartidas como parámetro de comparación, en conjunto con índices que también pueden considerar la abundancia relativa (Lozupone and Knight, 2008).

En general, para referirse a los miembros de las comunidades microbianas que han sido caracterizadas a través de técnicas moleculares, se prefiere utilizar los términos “filotipo” o unidad operacional taxonómica (OTU), en vez de “especie”. En el dominio Bacteria, la reproducción es asexual y los

eventos de recombinación génica horizontal, dificultan la definición de lo que constituye una especie. Esto ha ocasionado que las especies sean definidas de acuerdo al porcentaje de homología que presentan con otros individuos, siendo un 97% de similitud en el gen 16S rRNA completo, uno de los puntos de corte más utilizados para esta definición (Gevers et al., 2005)

Uno de los primeros estudios que introdujo la utilización de *high-throughput pyrosequencing* en la descripción del microbioma oral, fue el de Keijser y cols. (Keijser et al., 2008) secuenciando amplicones de PCR de la 16S rRNA, provenientes de un pool de 71 muestras de saliva y otro pool de 98 muestras de placa supragingival. Las 197,600 secuencias analizadas mostraron en total en estas muestras 318 géneros bacterianos. Las muestras de saliva mostraron en total 3.621 filotipos (definidos al nivel de 6% de diferencia en la secuencia) y las de placa mostraron en total 6.888 filotipos. Estos resultados nos orientan hacia una nueva visión en torno a la diversidad encontrada en la microbiota bucal de pacientes sanos, la cual, según estos autores asciende a 19.000 filotipos, siendo considerablemente más alta de lo descrito con anterioridad (Keijser et al., 2008). Sin embargo, este estudio debe ser interpretado con cierta precaución ya que errores en la generación de amplicones por PCR durante la amplificación inicial, durante la secuenciación y el procesamiento de las secuencias, pueden sobre-estimar la diversidad

microbiana (Haas et al., 2011). En otro estudio, Zaura y cols. (Zaura et al., 2009), también utilizando amplificación del gen 16S rRNA y 454-pyrosequencing , caracterizaron el microbioma oral de 3 sujetos oral y sistémicamente sanos, tomando muestras de distintos nichos intraorales como superficies dentarias, cara interna de mejilla, paladar y lengua, entre otros. Encontraron aproximadamente 500 OTUs , por cada individuo y concluyeron que hubo una gran similitud en la composición del microbioma de dichos sujetos. Debido a estos resultados, estos autores sostienen la existencia de un “core microbiome” (microbioma núcleo o base) presente en condiciones de salud oral y sistémica (Zaura et al., 2009). Posteriormente, Lazarevic y cols., utilizando amplificación del gen 16S rRNA y 454-pyrosequencing, evaluaron la composición del microbioma salival de 5 sujetos de manera prospectiva, encontrando una cantidad de OTUs similar al estudio anterior, con 583 filotipos definidos al 97% de similitud. Además concluyeron que en estos sujetos la composición del microbioma había permanecido estable durante el período estudiado, que fue de 29 días (Lazarevic et al., 2010). Con relación al microbioma de la mucosa oral, Contreras y cols. (Contreras et al., 2010) caracterizaron la composición bacteriana de este nicho en 6 sujetos amerindios del amazonas a través de la amplificación del gen 16S rRNA y 454-pyrosequencing, encontrando 1034 OTUs (definidas al 97% de similitud),

correspondientes a 10 phyla, 30 familias y 51 géneros bacterianos (Contreras et al., 2010). Respecto a la caracterización de la microbiota endodóntica, Li y cols. (Li, 2010) compararon la composición microbiana obtenida utilizando 454-pyrosequencing y sanger sequencing en 7 muestras de infecciones de origen endodóntico, alcanzando mejor cobertura y caracterización con pyrosequencing. Otro de los grandes aportes de esta técnica se refiere a la posibilidad de comparar la totalidad de la composición microbiana de distintos ecosistemas, reflejo de ello es el estudio realizado por Koren y cols. (Koren et al., 2011) en el cual compararon distintos microbiomas (placa bacteriana supragingival, intestinal y placas de ateroma), provenientes de 15 pacientes con aterosclerosis y 15 pacientes sistémicamente sanos. En sus resultados, encontraron bacterias de los géneros *Veillonella* y *Streptococcus* en las placas ateromatosas, estableciendo que dichos microorganismos podían provenir de la cavidad bucal, abriendo nuevas posibilidades en torno al conocimiento de esa patología (Koren et al., 2011).

Microbioma Subgingival

Respecto al microbioma subgingival, existen pocos estudios que caractericen de manera detallada su composición en individuos sanos o con periodontitis. En general el análisis de la microbiota subgingival se ha limitado al uso de métodos dependientes del cultivo, por lo tanto, algunos microorganismos

continúan sin ser identificados y debidamente caracterizados (Sakamoto et al., 2005). Sin embargo, ha habido algunas aproximaciones a la determinación de la diversidad microbiana subgingival, sin la utilización de técnicas de cultivo, basándose en el aislamiento de DNA de este nicho ecológico, su amplificación, clonamiento y posterior secuenciación. Como un primer acercamiento a este análisis, Kroes y cols. (Kroes et al., 1999), caracterizó 59 filotipos o especies diferentes a través de la amplificación del gen 16S rRNA de muestras de placa subgingival provenientes de un sujeto, con diagnóstico de gingivitis. Sólo el 24% de los filotipos encontrados pudo ser apreciado por técnicas de cultivo, lo cual según los autores sugiere que hay una proporción importante de esta microbiota que todavía se encuentra pobremente caracterizada, a pesar de que el medioambiente subgingival nos sea familiar y bien estudiado (Kroes et al., 1999). Con relación a una caracterización más amplia de esta microbiota en pacientes con periodontitis, Paster y cols., en 2001, utilizando métodos moleculares filogenéticos basados en la amplificación y clonación del gen 16S rRNA, hicieron un gran aporte en la determinación de la diversidad bacteriana de la placa subgingival obtenida desde sujetos periodontalmente sanos y con distintos diagnósticos de enfermedad periodontal. En sus resultados se aprecian diferencias a nivel de especies o clones entre las muestras de placa subgingival en diferentes estados de salud periodontal, con un gran número de

filotipos encontrados sólo en la placa subgingival de pacientes con periodontitis. Como ejemplo, en las muestras de sitios enfermos, se encontraron 10 filotipos constituidos sólo por clones, que podrían representar patógenos potenciales aún no reconocidos ni cultivados (Paster et al., 2001). Por otra parte, Sakamoto y cols. (Sakamoto et al., 2004), caracterizaron los cambios en los perfiles orales microbianos después del tratamiento periodontal, basándose en el análisis de los genes ribosomales de la 16S rRNA con T-RFLP (Terminal – restriction fragment length polymorphism). Este estudio recolectó muestras de saliva y placa subgingival de tres pacientes antes y tres meses después del tratamiento periodontal, uno con diagnóstico de periodontitis agresiva y dos pacientes con periodontitis crónica. Estos autores encontraron una reducción marcada en el número total de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y *T. socranskii*, después del tratamiento periodontal en los sujetos estudiados (Sakamoto et al., 2004). En otra determinación de la microbiota bacteriana normal de la cavidad bucal, Aas y cols. (Aas et al., 2005), analizaron muestras tomadas de superficies mucosas y dentarias (placa supra y subgingival), provenientes de individuos periodontalmente sanos y sin lesiones de caries. Este estudio, utilizó como método la amplificación y clonación de parte del gen 16S rRNA, generando en total 2,598 clones, en los cuales se detectaron 141 filotipos de los cuales un 60% eran no cultivables. En general, cada sitio analizado presentó 20-30

filotipos diferentes que predominaban. Recientemente, otro estudio de Bik y cols., también tuvo el objetivo de caracterizar la diversidad de la microbiota oral en pacientes sanos, utilizando como método la amplificación y clonación de casi la totalidad del gen 16S rRNA. Analizaron separadamente muestras obtenidas en distintos nichos orales de 10 sujetos y un pool de muestras de placa subgingival de estos mismos individuos. En total obtuvieron 11,368 secuencias, 247 filotipos al nivel de especie (definidas al 99% de similitud de la secuencia) y 9 phyla. Para el pool de placa subgingival, obtuvieron 1083 clones, en donde encontraron 128 OTUs (Bik et al., 2010). Estos resultados, al igual que los provenientes de otros estudios que utilizan metodologías basadas en la amplificación y clonación el gen 16S rRNA, deben ser interpretados con cuidado respecto al número de filotipos u OTUs encontrados, ya que esta técnica tiene limitaciones en este aspecto. La más importante, además de su laboriosidad, es la imposibilidad de clonar en *Escherichia coli* varias especies bacterianas con contenidos atípicos de G+C, lo que influye en una subestimación de la riqueza total de las comunidades microbianas estudiadas (Rajendhran and Gunasekaran, 2011).

Por otra parte, también se han realizado algunos estudios utilizando caracterización del gen 16S rRNA y clonación relacionados con el cambio microbiano que ocurre a nivel subgingival, específicamente en torno a la

transición desde el estado de salud periodontal a enfermedad (Kumar et al., 2005; Kumar et al., 2006; Ledder et al., 2007). Estos trabajos concluyen fundamentalmente que los cambios en el estado periodontal están acompañados por variaciones dentro la comunidad microbiana subgingival. Existen otras situaciones que además pueden estar alterando la composición del microbioma subgingival propia del hospedero. En un estudio reciente, Shchipkova y cols. (Shchipkova et al., 2010), evaluaron el efecto del hábito tabáquico a nivel del microbioma subgingival en 15 pacientes con periodontitis crónica, también a través de la amplificación y clonación del gen 16S rRNA. Sus resultados revelaron que el perfil microbiano de los pacientes fumadores es distinto de los no fumadores, con diferencias significativas a nivel de prevalencia y abundancia de microorganismos asociados a salud y enfermedad (Shchipkova et al., 2010).

En general, como consta de acuerdo a los estudios revisados, la mayoría de las descripciones del biofilm subgingival que utilizan técnicas moleculares, han sido realizadas por medio de amplificación y clonación del gen 16S rRNA. A la fecha, no se dispone de estudios que analicen el microbioma subgingival en su totalidad, siendo necesaria la incorporación de técnicas como el *high-throughput pyrosequencing*, con el fin de disponer de una caracterización más completa del biofilm subgingival.

Relación del sangrado al sondaje (BOP) con la composición de la microbiota subgingival

Como se ha visto anteriormente, los estudios revisados que caracterizan la composición de la microbiota subgingival, demuestran fundamentalmente que los perfiles microbianos asociados con salud o enfermedad periodontal difieren entre sí, confirmando la etiología microbiana de la enfermedad. Sin embargo, para el diagnóstico de la periodontitis, no se utilizan perfiles microbiológicos sino parámetros clínicos que revelen el estado inflamatorio de los tejidos periodontales, como resultado de cambios en el microbioma subgingival. A nivel del sitio periodontalmente afectado, son dos los factores más críticos que se evalúan para definir la presencia de la enfermedad; a saber, la profundidad del saco periodontal y el estado inflamatorio del saco evidenciado por el BOP (Socransky and Haffajee, 2005). De estos dos, el BOP, es considerado el parámetro que representa más fielmente la presencia de inflamación (Greenstein et al., 1981) y es el más vinculado con los fenómenos biológicos que subyacen el proceso de inflamación (Offenbacher et al., 2007). Estas afirmaciones se fundamentan en que este signo clínico (BOP) tiene una correlación positiva con el tamaño del infiltrado inflamatorio (Engelberger et al., 1983) y también su presencia se relaciona con una reducción en el porcentaje de epitelio adyacente (a las superficies dentarias asociadas con sangrado)

(Polson et al., 1981). En el mismo estudio de Polson y cols. se realizó un análisis histomorfométrico, el cual reveló que en sitios con BOP el epitelio disminuyó en proporción a expensas de un incremento en el porcentaje de tejido conectivo infiltrado (Polson et al., 1981). Además, existe una correlación positiva entre BOP y citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β), quimiocinas (IL-8) y marcadores de destrucción tisular (MMP-8) (Teles et al., 2010). Por otra parte, este signo (BOP) ha sido utilizado en la creación de índices clínicos que evalúan el estado de salud periodontal y enfermedad (Loe and Silness, 1963), gracias a su objetividad, reproducibilidad y fácil manejo clínico. Debido a lo anterior, sería de gran valor el establecer cuál es la relación entre este signo clínico y los factores etiológicos de la enfermedad periodontal, a nivel del biofilm subgingival.

Generalmente el BOP, como medición clínica, ha mostrado una modesta sensibilidad y especificidad, además de un bajo valor predictivo positivo para la progresión de la periodontitis y un alto valor predictivo negativo (Lang et al., 1991), por lo que ha seguido siendo utilizado como un indicador de estabilidad periodontal durante la terapia y mantención periodontal (Badersten et al., 1985; Rahardjo et al., 2005). Sin embargo, en un estudio longitudinal de Tanner y cols. (Tanner et al., 2007), realizado en sujetos con periodontitis crónica leve e individuos sanos periodontalmente, demostró que los sitios que experimentaron

ganancia en el nivel de inserción clínica no presentaron BOP y en un 71% de los sitios que tuvieron pérdida de inserción se detectó BOP, existiendo una correlación positiva entre progresión de la periodontitis y el BOP.

La relación entre BOP y la composición microbiana ha sido investigada anteriormente. Armitage y cols., (Armitage et al., 1982) encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de espiroquetas y algunos parámetros clínicos como Índice de Placa (PI), Índice gingival (GI) , BOP y PD, utilizando microscopía de campo oscuro. Este estudio analizó muestras obtenidas de 60 sujetos y se debe destacar que en las correlaciones realizadas utilizando el parámetro BOP, consideraron sitios con distinta profundidad al sondaje. Posteriormente, Baab y cols. (Baab and Opsvig, 1986) seleccionaron 11 sujetos con periodontitis moderada generalizada y tomaron muestras microbiológicas de sitios de 4 a 6 mm, con y sin BOP. A la comparación, encontraron que no hubo diferencias entre porcentaje de cocos, bacilos móviles o espiroquetas entre los sitios con y sin BOP, utilizando microscopía de contraste de fases. En otro estudio realizado por Socransky y cols. (Socransky et al., 1991) se evaluó la relación entre el recuento de 14 especies bacterianas de la microbiota subgingival y la condición clínica del sitio periodontalmente afectado. Consideraron 2,299 muestras de placa subgingival provenientes de 90 pacientes con distintos niveles de destrucción periodontal, midieron en los sitios

muestreados profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica, recesión gingival, enrojecimiento gingival y supuración. Encontraron que el recuento de la microbiota total cultivable aumentaba junto con el incremento de la profundidad al sondaje, en tanto que pocas especies diferían en la frecuencia de detección y porcentaje en el recuento de la microbiota al comparar los sitios que sangraban con los que no lo hacían, destacándose una relación entre el sangrado al sondaje y la presencia de *B. intermedius* I (Socransky et al., 1991). Estos resultados deben interpretarse con cuidado, debido a las limitaciones de la metodología utilizada, la cual consistía en una técnica molecular dependiente de cultivo y sólo centrada en la detección de 14 especies de la microbiota subgingival. Tiempo después, nuevamente Socransky y cols., en el mismo artículo en el que describen la configuración de los distintos complejos bacterianos en el biofilm subgingival, evaluaron la posible asociación de éstos con los parámetros clínicos considerados de mayor importancia en el diagnóstico periodontal. Esos resultados indican que algunas especies del complejo naranja y todas las del complejo rojo, aumentaban en frecuencia de detección y en número, a medida que se incrementaba la profundidad al sondaje (PPD) en dichos sitios. Además, todas las especies del complejo rojo se encontraban también mayormente vinculadas a los sitios que presentaban sangrado al sondaje ($p < 0,001$) (Socransky et al., 1998; Socransky and

Haffajee, 2005). La limitante en la interpretación de dichos resultados radica en que la caracterización microbiana corresponde sólo a las variaciones de 40 especies bacterianas.

La relación entre inflamación y la composición del microbioma subgingival puede ser bidireccional. No solamente los cambios en la composición del microbioma pueden ser causa de un aumento en la inflamación periodontal local, también el aumento en la inflamación podría influir en la composición del microbioma subgingival. Una de las explicaciones que fundamenta la presencia de inflamación, como un factor que altera la composición de la microbiota subgingival, establece que las especies que se encuentran elevadas en sitios inflamados pueden haberse beneficiado de la inflamación, en parte por el aumento del fluido gingival crevicular y además porque este fluido se encuentra enriquecido de productos de degradación tisular, que pueden favorecer el crecimiento de varias de las especies con metabolismo asacarolítico (p. ej.; *P. gingivalis* y *T.denticola*) (Socransky and Haffajee, 2005). Por otra parte, el sangrado como resultado de la inflamación gingival, va a contribuir a elevar la concentración de hemina a nivel subgingival, pudiendo ser un determinante que seleccione la presencia de ciertas especies bacterianas (p. ej. *P. gingivalis* o *Prevotella sp.*), para las cuales la hemina no sólo es vital para su crecimiento sino que también regula actividades asociadas

a la virulencia de *P. gingivalis* (Lamont and Jenkinson, 1998). Respecto a la presencia de inflamación y al cambio en la composición de la microbiota subgingival, sólo se dispone de estudios que evalúan la presencia y cantidad de grupos de patógenos periodontales putativos y el BOP (Demmer et al., 2008; Socransky et al., 1991; Socransky et al., 1998; Tanner et al., 2007).

Debido a los datos recientemente expuestos, resulta imperativo contar con estudios que caractericen la relación del BOP con la composición de la microbiota y contemplen en su diseño el cambio de la microbiota registrado conforme varía la Profundidad al Sondaje. De lo contrario, es muy difícil discriminar si la relación del BOP con ciertos marcadores microbiológicos se debe a la inflamación periodontal o a la influencia de la variación en otros parámetros clínicos (PD). Además, reconocemos la necesidad de realizar un análisis centrado en la totalidad del microbioma subgingival y su comportamiento en relación al aumento de la inflamación, evidenciada clínicamente a través del BOP. La caracterización a realizarse en este estudio es de gran relevancia, porque como se ha descrito anteriormente, esta microbiota es en gran parte no cultivable y varios de esos filotipos recientemente identificados pueden tener un rol en la etiología de la periodontitis. Debido a este conocimiento, autores sugieren que la etiología de la periodontitis es bastante más compleja que el asociar bacterias Gram (+) con

salud periodontal y bacterias Gram (-) como el agente causal de esta enfermedad (Kumar et al., 2006). En conclusión, nuestro estudio pretende determinar cuál es la significancia del signo clínico BOP en términos microbiológicos, para poder caracterizar de mejor manera cómo afecta la presencia de BOP la composición microbiana y también cuál es la influencia de la microbiota en la perpetuación de la inflamación. Esto es muy relevante, debido a que la evaluación del BOP es parte integral de la examinación periodontal y resulta indispensable saber qué está reflejando a nivel microbiológico, considerando la etiología infecciosa de la periodontitis. Por otra parte, el lograr vincular nuevas especies con mayores niveles de inflamación (representado en este estudio a través del BOP), abre la posibilidad de asociar nuevos microorganismos con dicho signo clínico, pudiendo desarrollarse posteriormente estudios longitudinales monitoreando estos patógenos y evaluar si pueden ser considerados como un marcador de progresión, como ha sido demostrado con otras bacterias del complejo rojo (Socransky and Haffajee 2005) .

Debido a los antecedentes expuestos, se plantea que existen diferencias en la composición del microbioma subgingival de sitios periodontalmente afectados con y sin sangrado al sondaje. El objetivo general de este estudio será caracterizar en detalle la riqueza de especies y la estructura del

microbioma subgingival, en sitios con y sin presencia de inflamación, evidenciada a través del sangrado al sondaje. Para ello, podemos apoyarnos en el advenimiento de las nuevas tecnologías como el *high-throughput pyrosequencing*, que permite una caracterización completa del microbioma de manera más económica y en menor tiempo que otras técnicas.

Hipótesis

Dentro de los signos clínicos que caracterizan la periodontitis, el sangrado al sondaje, es considerado como el parámetro clínico que representa más fielmente la presencia de los fenómenos biológicos que subyacen la inflamación. A su vez, el estado inflamatorio del saco periodontal, es uno de los factores que se relaciona directamente con la composición de la microbiota subgingival, siendo ésta uno de los factores de riesgo más importantes en la progresión de la periodontitis. En razón a lo anteriormente expuesto, **nuestra hipótesis establece que existen diferencias en la composición y cantidad del microbioma subgingival de sitios con y sin sangrado al sondaje, provenientes de pacientes con periodontitis crónica.**

Objetivos

Objetivo General

- Caracterizar la diversidad de especies y cantidad del microbioma subgingival, en sitios con y sin sangrado al sondaje, provenientes de pacientes con periodontitis crónica.

Objetivos Específicos

- Secuenciar la totalidad del microbioma subgingival en muestras de placa subgingival en sitios periodontalmente afectados con y sin sangrado al sondaje, provenientes de pacientes con periodontitis crónica.

- Comparar la composición de las comunidades microbianas encontradas en muestras de placa subgingival en sitios periodontalmente afectados con y sin sangrado al sondaje, provenientes de pacientes chilenos con periodontitis crónica.

- Cuantificar la carga bacteriana total en las muestras de placa subgingival obtenidas de sitios periodontalmente afectados con y sin sangrado al sondaje, provenientes de los sujetos antes mencionados.

Materiales y métodos

1- Selección de Pacientes

Este trabajo contó con la aprobación de Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo n°1). Los individuos que se incluyeron en este estudio, debían tener diagnóstico clínico de periodontitis crónica. Fueron reclutados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. La selección de los pacientes se realizó de acuerdo a los criterios internacionales establecidos para el diagnóstico de periodontitis crónica moderada a severa (Armitage, 1999).

Criterios de Inclusión

- Ser mayor de 35 años

- Presentar al menos 14 dientes naturales

- Al examen clínico presentar sangrado al sondaje en más de un 18% de los sitios (Offenbacher et al., 2007).

- Al menos 4 sitios con profundidad al sondaje de 5mm y pérdida del nivel de inserción clínica \geq 3mm.

Criterios de Exclusión

- Haber recibido algún tipo de terapia periodontal
- Fumar (Exposición al tabaco de 10 paquetes al año o más) (Shchipkova et al., 2010).
- Presentar enfermedades sistémicas que afectan la progresión de la periodontitis
- Condiciones médicas que requieran premedicación con antibióticos
- Administración de medicamentos tales como antibióticos, anti-hipertensivos, anticoagulantes, anti-inflamatorios esteroidales y no esteroidales, en los 6 meses previos al comienzo del estudio.
- Si es mujer, no debe estar embarazada ni consumir anticonceptivos orales.

A todos los individuos incluidos en el estudio se les explicó el procedimiento a realizar y firmaron un Consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (ver Anexo nº 2).

Además, inmediatamente después de que se realizó la toma de muestras biológicas, todos los pacientes ingresaron a un programa de tratamiento periodontal.

Mediciones clínicas

Los parámetros clínicos de profundidad al sondaje (PPD), nivel de inserción clínica (CAL), medidas dicotómicas de acumulación de placa (PI) y sangrado al sondaje (BOP), fueron evaluados en cada diente.

Definiciones operacionales de las mediciones

- Profundidad al Sondaje (PPD, del inglés “Pocket probing depth”) : Se define como la distancia desde el margen gingival hasta la ubicación del extremo de una sonda periodontal insertada en el saco periodontal o surco gingival con una fuerza de sondeo moderada (0,2 gr) (Garnick and Silverstein, 2000). Se mide en milímetros (mm) (Ramfjord, 1967).
- Nivel de Inserción Clínica (CAL, del inglés “Clinical attachment loss”): Se define como la distancia entre el límite amelocementario y la ubicación del extremo de la sonda periodontal insertada en el saco periodontal o surco gingival con una fuerza de sondeo moderada. Se mide en milímetros (mm) (Ramfjord, 1967).
- Medida dicotómica del Índice de Placa (PI, del inglés “Plaque Index”): Corresponde a una versión simplificada del Índice de Placa descrito por Silness y Löe (Silness and Loe, 1964), en donde se registra de forma dicotómica la

presencia o ausencia de placa (Ainamo and Bay, 1975), calculándose posteriormente el porcentaje de sitios con presencia de placa.

- Sangrado al sondaje (BOP, del inglés “Bleeding on probing”): Corresponde al sangrado que se produce dentro de los 15 segundos posteriores a la realización del sondeo con una fuerza moderada hasta el fondo del saco periodontal o surco gingival (Muhlemann and Son, 1971). Posteriormente se calculó el porcentaje de aquellos sitios positivos para la presencia de este signo clínico.

Se examinaron 6 sitios por diente: mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual. Las mediciones las llevó a cabo un examinador calibrado, quien utilizó una sonda manual milimetrada (UNC15, HuFriedy, Chicago, IL, USA).

2.- Obtención de las muestras

Las muestras de placa subgingival fueron tomadas en dos sitios periodontalmente afectados por paciente. Uno de ellos con una PPD de 5mm, CAL \geq 3mm y presencia de sangrado al sondaje. El otro sitio también con una PPD de 5 mm, CAL \geq 3mm y sin sangrado al sondaje. Ambos sitios seleccionados para la toma de muestra, fueron a nivel interproximal en dientes no adyacentes. Las muestras se tomaron en un día distinto al que se realizaron

las mediciones, en una sesión posterior. Si el sitio escogido como sin sangrado al sondaje, comenzó a sangrar en la toma de la muestra fue descartado, por lo que se debió considerar otro saco periodontal con PPD de 5mm.

Previo a la toma de cada muestra, se aisló el sector de la toma de muestra escogido con torundas de algodón (para evitar la contaminación con saliva) y con una cureta Gracey estéril se removió la placa supragingival. A continuación, se tomó la muestra de placa subgingival con otra cureta Gracey estéril e inmediatamente se dejó en un tubo de polipropileno que contenía 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM ácido etilenediaminetetraacético (EDTA), pH 7.6). Las muestras fueron transportadas en hielo al Laboratorio de Microbiología Bucal y conservadas a -80°C hasta su posterior procesamiento.

3. Aislamiento del DNA bacteriano

Para ello fue necesario llevar a cabo un protocolo de lisis modificado, el cual contemplaba como primer paso, la incubación de las muestras por 30 minutos a 37°C con un buffer de lisis, el cual contenía fundamentalmente Lisozima (20 mg/ml). Posteriormente, se continuó la aislación del DNA bacteriano, utilizando el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al término de este procesamiento, se midió la concentración del DNA obtenido a 260 nm y su

calidad (relación 260/280 nm) por espectrofotometría (Nanodrop), con el fin de realizar una dilución del DNA de cada muestra que tuviese una concentración de 2 ng/μl.

4. Determinación del microbioma bacteriano subgingival a través de pyrosequencing

Las bibliotecas de amplicones se prepararon usando primers de fusión de del gen 16S rRNA con 13 MIDs diferentes (titanium primer “A” o “B”; quality control tag; MID y secuencias específicas templados de 16S rRNA bacteriano universal, forward 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', reverse 5'-CYIACTGCTGCCTCC CGTAG-3') (Sundquist et al., 2007). Este par de primers universales amplifican entre V1 y V2, abarcando aproximadamente 420 bp de la secuencia del 16S rRNA. Se escogieron estas regiones del gen 16s rRNA (V1-V2) porque se ha demostrado el mejor poder de resolución que éstas tienen a distintos niveles taxonómicos, en comparación a otras regiones variables de éste gen (Sundquist et al., 2007). Además, esto también ha sido corroborado por Nasidze y cols. (Nasidze et al., 2009b) para especies bacterianas del microbioma oral, confirmando que las regiones V1-V2 son las más informativas para detectar diversidad. Con el fin de secuenciar cada amplicon con la 454 FLX Titanium chemistry, se amplificaron 10 ng de DNA en reacciones de PCR por triplicado. Las amplificaciones exitosas fueron

analizadas por electroforesis en geles de agarosa y los productos de PCR se purificaron con el protocolo del kit Qiagen QIAquick ®. Las fotografías de los geles fueron registradas con el Gel Doc Image System (Bio-Rad). La cuantificación y la calidad de cada librería de amplicones fue evaluada a través de análisis de Experion DNA chip (Bio-Rad). Las bibliotecas de amplicones fueron agrupadas en cantidades equimolares en 3 grupos diferentes, esta organización se determinó de acuerdo el MID utilizado, siendo 2 grupos de 13 bibliotecas y uno de 4 bibliotecas, conformando un total de 30 bibliotecas para la secuenciación. Para finalizar este proceso, las muestras fueron llevadas al Center for Applied Genetics and Technology de la University of Connecticut. Brevemente, en dicho laboratorio se procedió a realizar emulsiones de PCR (emPCR), recuperación, enriquecimiento y se realizó la secuenciación unidireccional de acuerdo a lo establecido en Sequencing methods manuals (Roche Life Sciences, Oct. 2009) y posteriormente se realizó el análisis del microbioma a través de 454 pyrosequencing.

5. Determinación de la Carga Bacteriana Total presente en las muestras

La carga bacteriana total presente en todas las muestras se cuantificó a través de la técnica real-time PCR (qPCR), utilizando partidores universales para gen 16S rRNA (forward 5' TCC TAC GGG AGG CAG CAG T 3' , reverse 5' GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3'), descritos por Nadkarni y cols.

(Nadkarni et al., 2002). Estos primers fueron chequeados en la base de datos del RDP (Cole et al., 2005) demostrándose su homología con 262 de un total de 1.921.179 secuencias presentes en RDP. Para llevar a cabo la reacción de qPCR, se utilizó la mix Fast SYBR Green Mix 2X (Applied Biosystems), primers a una concentración final de 500 nM, agua purificada para PCR para completar el volumen final de la reacción (20 ul) y 1 ul de DNA extraído de cada muestra. Se utilizó el termociclador CFX96 Real-time system, C1000 thermocycler (Bio-Rad) y las condiciones para la amplificación fueron: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y 58°C por 30 segundos. La curva estándar para la cuantificación se construyó de acuerdo al número de copias del gen 16S rRNA, partiendo desde 10^8 hasta 10^2 copias amplificando DNA genómico del microorganismo *Fusobacterium nucleatum* cepa ATCC 10953. Cada muestra se amplificó por triplicado al igual que la curva estándar.

6. Análisis de los Datos

Procesamiento de las secuencias y su análisis

Para el análisis de las secuencias se utilizó el software mothur (Schloss et al., 2009) . En un inicio, a las secuencias se les removió el primer utilizado para la secuenciación y los MIDs. Además se filtraron y cortaron de acuerdo a distintos parámetros que se detallan a continuación. Debían tener una longitud mínima de 200 bp y máxima de 420 bp y un máximo de homopolímeros de 8. Además, se revisó la calidad de la secuencia de acuerdo al quality file utilizando una ventana movable de 50 bp. Si en esta ventana, el quality score bajaba de 35 la secuencia fue cortada a este nivel.

Para las alineaciones de referencia se usó la base de datos SILVA (Pruesse et al., 2007) y el alineamiento se cortó para comparar las secuencias sobre las mismas posiciones en el gen 16S rRNA. Las secuencias con 2 bp de disimilitud a una secuencia mas abundante fueron colapsadas utilizando el algoritmo de “Pseudo-linkage single” (Huse et al., 2010), para remover secuencias con posibles errores. Las secuencias quiméricas fueron removidas utilizando Uchime (Edgar et al., 2011), de la forma como está implementado en mothur.

Posterior a las etapas de pre-procesamiento de las secuencias, la aproximación escogida para hacer el análisis de las comunidades microbianas será basada en OTUs, definidas al 3 % de disimilitud, usando el mismo software

antes mencionado (mothur). Se escogió este punto de corte, con el fin de agrupar secuencias similares en grupos (OTUs), las cuales estarían representando especies a nivel taxonómico (Schloss and Handelsman, 2005). Para ello, se generó una matriz de distancias calculando las distancias entre secuencias de manera pareada, penalizando espacios (“gaps”) consecutivos como un solo espacio. El algoritmo utilizado para agrupar las OTUs, fue el “*average neighbour algorithm*” (Schloss and Westcott, 2011). Para la clasificación de OTUs se utilizó en primera instancia el RDP Classifier (Wang et al., 2007) implementado en mothur, para clasificar las secuencias individualmente y luego cada OTU hasta el nivel género, otorgándoles clasificación taxonómica basada en la asignación de la mayoría de las secuencias al interior de cada OTU. Las OTUs también se clasificaron a nivel de especies sólo en el caso en que la secuencia representativa tuviera una homología de 97% o más con un “Oral Taxon” en el HOMD (Chen et al., 2010b).

Fundamentalmente, el análisis se dividió en dos secciones, relacionadas con los conceptos α y β – diversidad de las comunidades microbianas.

Las estimaciones de α - diversidad en las comunidades se calcularon por medio de distintos índices, de la forma en que se encuentran implementados en el software mothur. En primer lugar, se calculó la cobertura utilizando el “ Good-

Turing Coverage” (Good I.J, 1953), que va de un 0-100% y cuya fórmula es la siguiente:

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

En donde,

n_1 = el número de OTUs que ha sido muestreado una vez

N = número total de individuos en la muestra

Posteriormente, se normalizó el número de secuencias en todas las muestras al número presente en la muestra secuenciada con menos profundidad, y se calcularon diversos parámetros:

- a) Riqueza: Se determinó la riqueza total u observada (S_{obs}) utilizando mothur y la riqueza estimada ($S_{catchAll}$), que fue calculada utilizando el modelamiento matemático propuesto por Bunje y cols. (Bunge, 2011).
- b) Uniformidad (“Evenness”) : Se observó utilizando el Shannon Evenness Index, (Lloyd and Ghelardi, 1964) cuya fórmula es la siguiente:

$$SHEI = \frac{-\sum_{i=1}^m (P_i \cdot \ln P_i)}{\ln m}$$

En donde,

P_i = proporción de la comunidad ocupada por una determinada especie

m = número de especies presentes en la comunidad

Este índice presenta valores que van desde 0 a 1, a medida que nos acercamos al valor 1 significa que las abundancias relativas de los organismos presentes van igualándose, con lo cual el valor 1 significa que las comunidades son “perfectamente uniformes”.

c) Diversidad total:

Esta dimensión se calculó utilizando en primer lugar el npShannon diversity Index, el cual es la versión no paramétrica del Shannon Diversity Index y fue propuesto por Chao y cols. (Chao, 2000). Su interpretación es basada en el valor del índice, por lo tanto a mayor valor existe una mayor diversidad. La fórmula para calcular este índice es la siguiente:

$$\hat{H}_{shannon} = \sum_{i=1}^{S_t} \frac{\hat{C}\pi_i \ln(\hat{C}\pi_i)}{1 - (1 - \hat{C}\pi_i)^N}$$

$$var(\hat{H}_{shannon}) \approx \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^n \frac{\partial \hat{H}}{\partial n_i} \frac{\partial \hat{H}}{\partial n_j}$$

$$cov(f_i, f_j) = f_i(1 - f_i/S_{ACE}), i = j$$

$$cov(f_i, f_j) = -f_i f_j / S_{ACE}, i \neq j$$

En donde:

$$\hat{C} = 1 - \frac{n_1}{N}$$

$$\pi_i = \frac{n_i}{N}$$

n_1 : Número de individuos en cada OTU

N : Número de individuos de la muestra

S_i : Número total de OTUs

S_{ACE} : La riqueza estimada utilizando el ACE calculator

También se utilizó para medir diversidad el Inverse Simpson Index, que tiene como denominador el índice descrito por Simpson en 1949 (Simpson,1949). Al igual que el índice anterior aumenta conforme existe mayor diversidad. Este Índice habitualmente se expresa de forma recíproca ($1/ D_{Simpson}$) y la fórmula para calcularlo es la siguiente:

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}$$
$$var (D_{simpson}) = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} \left(\frac{n_i}{N}\right)^3 - \left(\sum_{i=1}^{S_{obs}} \left(\frac{n_i}{N}\right)^2\right)^2}{0.25N}$$
$$LCI_{95\%} = D_{simpson} - 1.96\sqrt{var (D_{simpson})}$$
$$UCI_{95\%} = D_{simpson} + 1.96\sqrt{var (D_{simpson})}$$

En donde:

S_{obs} : Número de OTUs observadas

n_i : Número de OTUs con i individuos

N : Número total de individuos en la comunidad

Dichos parámetros de se compararon entre ambos grupos estudiados (las comunidades microbianas provenientes de sitios con y sin sangrado), utilizando

Test T pareado o Wilcoxon Signed Rank test en caso de distribución no normal, con un p value < 0,05 considerado como estadísticamente significativo.

Respecto a la β – diversidad de las comunidades microbianas, se analizó la disimilitud entre comunidades por medio de la estimación de los índices Jaccard (Jaccard,1901) y Theta (Yue,2005). El índice de Jaccard describe fundamentalmente la disimilitud a nivel de los miembros (especies) presentes entre dos comunidades, por lo cual es un índice de carácter cualitativo. Se calcula de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$D_{Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}}$$

En donde:

S_{AB}: Número de OTUs compartidas entre comunidad A y B

S_A : Número de OTUs en la comunidad A

S_B : Número de OTUs en la comunidad B

Por otra parte, el Índice Theta es una medida de disimilitud que compara la estructura de dos comunidades, tomando en cuenta sus miembros y la abundancia relativa de éstos, siendo un índice de carácter más cuantitativo. La fórmula para calcular este índice es la siguiente:

$$D_{\Theta_{YC}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{S_T} a_i b_i}{\sum_{i=1}^{S_T} (a_i - b_i)^2 + \sum_{i=1}^{S_T} a_i b_i}$$

En donde:

S_T : Número total de OTUs presentes en la comunidad A y B

a_i : Abundancia relativa de cada OTU en la comunidad A

b_i : Abundancia relativa de cada OTU en la comunidad B

Las distancias entre las comunidades, obtenidas a través de la utilización de los índices recientemente descritos, se analizaron a través de Análisis de Coordenadas Principales, el cual es generado por el software mothur y graficado utilizando el software R (www.r-project.org/). Para evaluar si hubo diferencias estadísticamente significativas, se utilizó el test estadístico AMOVA, el cual se basa en las diferencias de las varianzas moleculares. Además, las distancias entre las comunidades también fueron observadas utilizando dendogramas para cada uno de los índices calculados (Jaccard y Theta). Para observar si el determinante ecológico estudiado (en este caso la inflamación, evidenciada a través del BOP) tenía un efecto en la organización de estas comunidades en los dendogramas, se utilizó el método propuesto por Lozupone y cols. denominado “UniFrac” (Lozupone et al., 2007). Brevemente, el análisis de UniFrac se basa en el cálculo de la distancia entre dos comunidades midiendo la fracción del largo de la rama (del dendograma) que es única de

cada comunidad. Se utilizaron los análisis de “unweighted” Unifrac, que es de carácter cualitativo y el “weighted” Unifrac que tiene características cuantitativas, ya que incorpora la abundancia relativa de los filotipos presentes (Lozupone et al., 2007).

Con el objetivo de comparar la composición de las comunidades microbianas entre los grupos (con y sin sangrado al sondaje), se usaron métodos basados en el análisis de taxones, como se señaló anteriormente. Dichas comunidades se compararon en tres niveles taxonómicos, que fueron OTUs, géneros y phyla, basados en los valores de abundancia relativa obtenidos en el análisis.

Para dichas comparaciones, a nivel de OTUs, género y phyla entre ambas comunidades se utilizó el software metastats (White et al., 2009), con el fin de observar aquellos miembros que se encuentran diferencialmente representadas en ambos grupos (con y sin sangrado). El software metastats es un método estadístico que tiene por objetivo detectar cómo varían los miembros de dos comunidades microbianas que han sido analizadas con técnicas de secuenciación masiva. Además, tiene por característica permitir analizar diferencias en OTUs muy poco frecuentes, utilizando el test de Fisher (White et al., 2009). Después de utilizar ese software, los p values se debieron ajustar con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Además, a nivel de género y phylum, se compararon los valores de abundancia relativa entre los grupos utilizando estadística tradicional como el Test t de Student pareado o Wilcoxon signed Rank test en caso de que la distribución sea no normal. También se analizaron las diferencias en la presencia y/o ausencia de géneros y phylum, utilizando McNemar test.

Análisis de la Carga Bacteriana Total y Datos Clínicos

Además para la comparación de la carga bacteriana total en ambos grupos, se consideraron los valores promedio de copias del gen 16S rRNA en cada muestra extrapolando el CT (Cycle Threshold) al valor correspondiente de la curva estándar (cuantificación absoluta). También se utilizó Test t de student pareado Wilcoxon signed Rank test en caso de que la distribución de estos datos fuera no normal. Respecto a los parámetros clínicos registrados en cada paciente fueron analizados estadísticamente, expresados en promedio \pm desviación estándar y porcentaje en los casos que correspondía. Para llevar a cabo el procesamiento estadístico de los análisis antes mencionados, se utilizó el software GraphPad Prism 5 y se consideró los resultados estadísticamente significativos cuando presentaban un $p < 0,05$.

Resultados

a) Población estudiada

Respecto a la población estudiada, se incluyeron un total de 15 sujetos en el estudio, cuyas características demográficas y clínicas se encuentran detalladas en la Tabla I.

Tabla I : Resumen de las características de los sujetos estudiados

| Sujetos estudiados | |
|---------------------------|------------------------------|
| (n = 15) | |
| Mujeres (%) | 60 |
| Edad (años \pm SD) | 44.7 \pm 6.7 |
| PD (mm \pm SD) | 3.1 \pm 0.7 |
| CAL (mm \pm SD) | 3.9 \pm 0.8 |
| BOP (% \pm SD) | 49.9 \pm 9.6 |
| PI (% \pm SD) | 86.2 \pm 19.8 |
| * Diagnóstico Periodontal | Periodontitis Crónica Severa |

- *PD, probing depth (en mm promedio \pm desviación estándar).*
- *CAL, clinical attachment loss (en mm promedio \pm desviación estándar).*
- *BOP, bleeding on probing (en porcentaje promedio \pm desviación estándar).*
- *PI, plaque index (en porcentaje promedio \pm desviación estándar).*
- Basado en criterio de definición de caso propuesto por el "CDC working group for use in population based surveillance of periodontitis" (Page and Eke, 2007).

b) Análisis de la α – diversidad

Respecto a los resultados correspondientes a la secuenciación de las muestras (Objetivo Específico N° 1), podemos apreciar en la Tabla II un resumen de lo obtenido en el análisis de las secuencias. Se observa el número total de secuencias obtenido en todo el análisis (109.861), la longitud de las secuencias después del procesamiento que en promedio fue de aproximadamente 185 bp, el rango referido a la cantidad de secuencias obtenidas por muestra que se obtuvieron, las cuales iban desde 1.375 a 6.377 secuencias. El rango correspondiente al “Good’s Turing Coverage” (Good I.J, 1953), mostró que fue posible apreciar desde un 95,3% a un 99,2 % de la composición microbiana existente en todas las comunidades estudiadas y la riqueza total obtenida entre todas las comunidades fue de 1.257 OTUs. En la Tabla III, se detalla el parámetro “Riqueza Observada” (S_{obs}) de cada comunidad, el cual corresponde al número de OTUs encontradas por cada muestra perteneciente a cada uno de los dos grupos (B y nB). La comunidad con mayor riqueza fue 8B con 304 OTUs y la que registro menor riqueza fue 14nB con 57 OTUs.

Tabla II: Resumen de lo obtenido en la secuenciación

| Nº total de secuencias | Longitud de las secuencias (en promedio) | Rango del número de secuencias por muestra | Rango del “Good-Turing Coverage” | Nº de OTUs (En total) |
|-------------------------------|---|---|---|------------------------------|
| 109.861 | ≈ 185 bp | 1.375 – 6.377 | 95,3 % - 99,2 % | 1257 |

Tabla III: Riqueza Observada de las comunidades por grupo

| Muestra | S_{obs} (Nº de OTUs) | Muestra | S_{obs} (Nº de OTUs) |
|----------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 1B | 197 | 1nB | 197 |
| 2B | 103 | 2nB | 151 |
| 3B | 217 | 3nB | 209 |
| 4B | 189 | 4nB | 109 |
| 5B | 128 | 5nB | 203 |
| 6B | 141 | 6nB | 203 |
| 7B | 300 | 7nB | 246 |
| 8B | 304 | 8nB | 236 |
| 9B | 256 | 9nB | 275 |
| 10B | 226 | 10nB | 231 |
| 11B | 158 | 11nB | 143 |
| 12B | 148 | 12nB | 131 |
| 13B | 194 | 13nB | 121 |
| 14B | 65 | 14nB | 57 |
| 15B | 86 | 15nB | 64 |

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje
- A ambas letras les antecede el número de sujeto estudiado

En la Tabla IV y V , se detalla el parámetro “Riqueza Estimada” (S_{CatchAll}) de las comunidades microbianas estudiadas, el cual corresponde al número estimado de OTUs que existen en cada muestra perteneciente a cada uno de los dos grupos (con y sin sangrado). Esta estimación se realizó utilizando el método de modelamiento matemático descrito por Bunge y cols. (Bunge, 2011), denominado “CatchAll”. Este método pretende describir de la forma más exacta posible la riqueza estimada, generando también un intervalo de confianza para cada muestra. La comunidad con mayor riqueza estimada fue 3nB con 418 OTUs y la que registro menor riqueza estimada fue 14nB con 53 OTUs.

Tabla IV: Riqueza Estimada de las comunidades con sangrado (B)

| Muestra | S_{catchAll} | Intervalo de confianza | |
|------------|-----------------------|------------------------|-------|
| | | Bajo | Alto |
| 1B | 342.3 | 199.0 | 771.2 |
| 2B | 134.4 | 106.8 | 186.6 |
| 3B | 276.4 | 195.8 | 495.7 |
| 4B | 184.7 | 165.9 | 214.5 |
| 5B | 145.6 | 123.3 | 183.4 |
| 6B | 171.8 | 114.5 | 321.8 |
| 7B | 259.4 | 226.4 | 309.1 |
| 8B | 346.1 | 267.6 | 475.7 |
| 9B | 223.6 | 195.7 | 265.6 |
| 10B | 292.3 | 170.4 | 822.9 |
| 11B | 153.5 | 127.7 | 203.6 |
| 12B | 299.3 | 242.7 | 389.5 |
| 13B | 257.8 | 205.7 | 351.2 |
| 14B | 87.4 | 62.6 | 147.3 |
| 15B | 107.9 | 84.1 | 172.4 |

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje
- A ambas letras les antecede el número de sujeto estudiado

Tabla V : Riqueza Estimada de las comunidades sin sangrado (nB)

| Muestra | S _{catchAll} | Intervalo de confianza | |
|-------------|-----------------------|------------------------|-------|
| | | Bajo | Alto |
| 1nB | 272.8 | 178.6 | 575.0 |
| 2nB | 240.2 | 162.9 | 414.0 |
| 3nB | 418.5 | 242.0 | 937.8 |
| 4nB | 118.1 | 101.2 | 150.7 |
| 5nB | 188.9 | 156.5 | 249.5 |
| 6nB | 196.6 | 151.2 | 278.8 |
| 7nB | 220.8 | 181.8 | 287.7 |
| 8nB | 218.2 | 187.5 | 267.3 |
| 9nB | 254.8 | 228.1 | 294.0 |
| 10nB | 248.3 | 209.9 | 311.2 |
| 11nB | 141.6 | 126.1 | 168.1 |
| 12nB | 132.7 | 111.7 | 177.3 |
| 13nB | 139.1 | 115.3 | 185.5 |
| 14nB | 53.9 | 40.9 | 91.3 |
| 15nB | 66.0 | 47.5 | 137.1 |

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje
- A ambas letras les antecede el número de sujeto estudiado

En la figura 1A y 1B se aprecia una comparación de la riqueza observada y estimada de las comunidades microbianas provenientes de sitios con y sin sangrado. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Test T pareado) entre las comunidades con y sin sangrado en ambos parámetros estudiados. Los valores en ambos gráficos están expresados como promedio y desviación estándar.

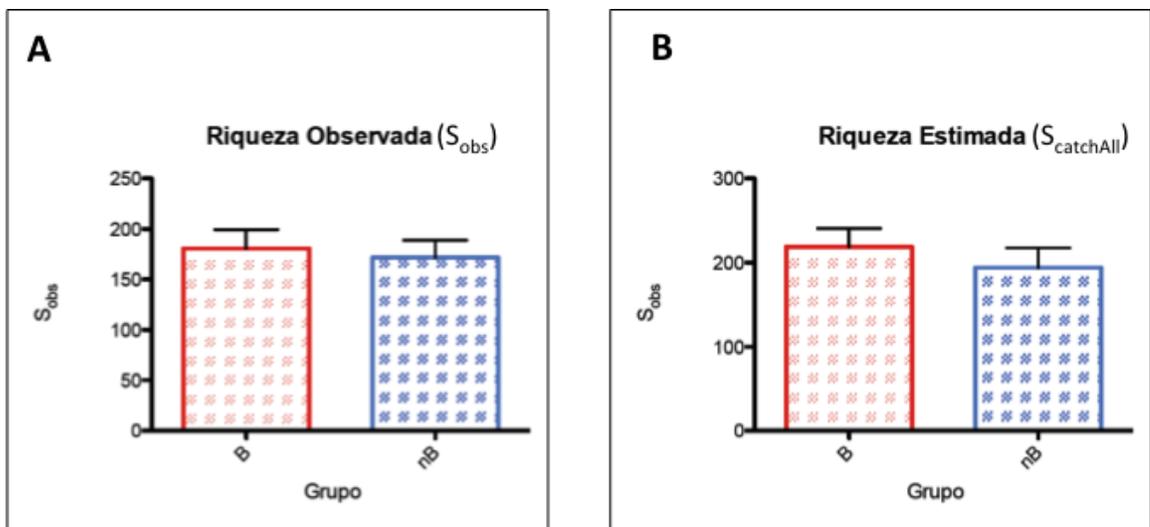


Figura 1A y 1B: Comparación de Riqueza Observada y Estimada

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

Dentro de los otros parámetros a revisar respecto a α -diversidad, encontramos el "Evenness", que hace referencia a la distribución relativa de las OTUs dentro de una comunidad, reflejando su uniformidad. En la figura 2, se observa que existen diferencias entre ambos grupos estudiados en relación a este estimador, comparando los valores obtenidos del "Shannon Evenness Index". Se aprecia que el grupo sin sangrado (nB) posee un mayor valor de este índice comparado con el grupo con sangrado (B), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Wilcoxon Signed Rank Test). El mayor valor de este índice en las comunidades sin sangrado, implica que las OTUs tienen una distribución más uniforme, presentando una abundancia relativa más similar. Por el contrario, en el caso de las comunidades con sangrado, existe un predominio de algunas OTUs y la mayoría de las especies son más escasas .

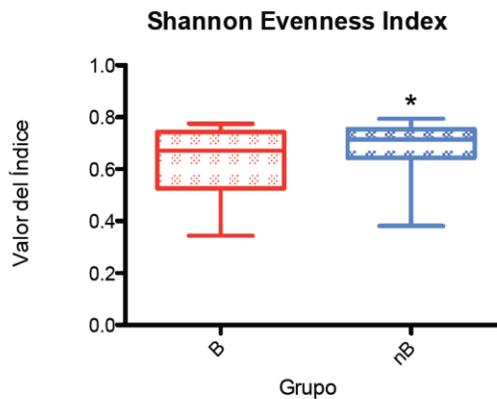


Figura 2. Shannon Evenness Index

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

Respecto a los estimadores de diversidad, se utilizaron el “non-parametric Shannon diversity Index” (npShannon Diversity Index) y el “Inverse Simpson Index”. Ambos reflejan cuán diversas son las comunidades microbianas, en cuanto a la riqueza de especies presentes y a su distribución (evenness), calculados de acuerdo a distintos descriptores matemáticos. En las figuras 3 y 4, se observa que la comparación de ambos índices mostró que no existen diferencias ($p > 0,05$)(Test T pareado), en cuanto a la diversidad total entre ambos grupos estudiados, por lo que presentaron una diversidad similar.

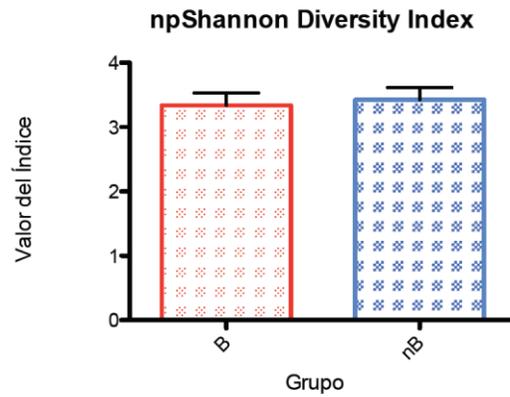


Figura 3. Non-parametric Shannon Diversity Index

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

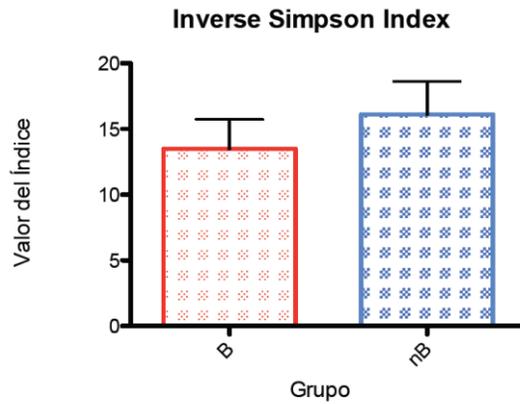


Figura 4. Inverse Simpson Index

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

b) Análisis de la β – diversidad

Con relación a los resultados correspondientes a la comparación entre las comunidades microbianas (Objetivo Específico N°2), se analizó en primer lugar las diferencias en los miembros y estructura global de las comunidades, separadas en dos grupos (B y nB). Para ello se construyeron dos dendogramas basados en coeficientes que miden la disimilitud entre comunidades microbianas. Primero, el dendograma de la figura 5 se basó en el Jaccard Index que mide la disimilitud entre dos comunidades microbianas en términos cualitativos, reflejando cambios en cuanto a los miembros de la comunidad. Utilizando los análisis de “weighted” y “unweighted UniFrac” (descritos previamente en la metodología) se obtuvo que las muestras con y sin sangrado no se separaron de manera estadísticamente significativa en el dendograma ($p > 0,05$). Este dendograma fundamentalmente mostró que el sangrado no fue el factor que determinó la distribución de las muestras, sino que estas se agruparon de acuerdo al sujeto de origen. Para poder observar este fenómeno de manera más objetiva, se construyó un gráfico en base a las distancias expresadas en el dendograma (basado en Jaccard Index), evaluando la distancia entre las muestras al interior de un sujeto, entre los sujetos con sangrado (B) y entre los sujetos sin sangrado (nB). En este gráfico (figura 6), se

corroboró que la distancia entre la composición de las muestras al interior de un sujeto (intra-sujeto con y sin sangrado) es menor que la determinada de sujeto a sujeto (inter-sujeto con y sin sangrado), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$, Kruskal Wallis test y Dunn post-hoc test). De esto se desprende que existen mayores diferencias en la composición microbiana entre los sujetos estudiados que la variación registrada de la microbiota al interior de un mismo individuo.

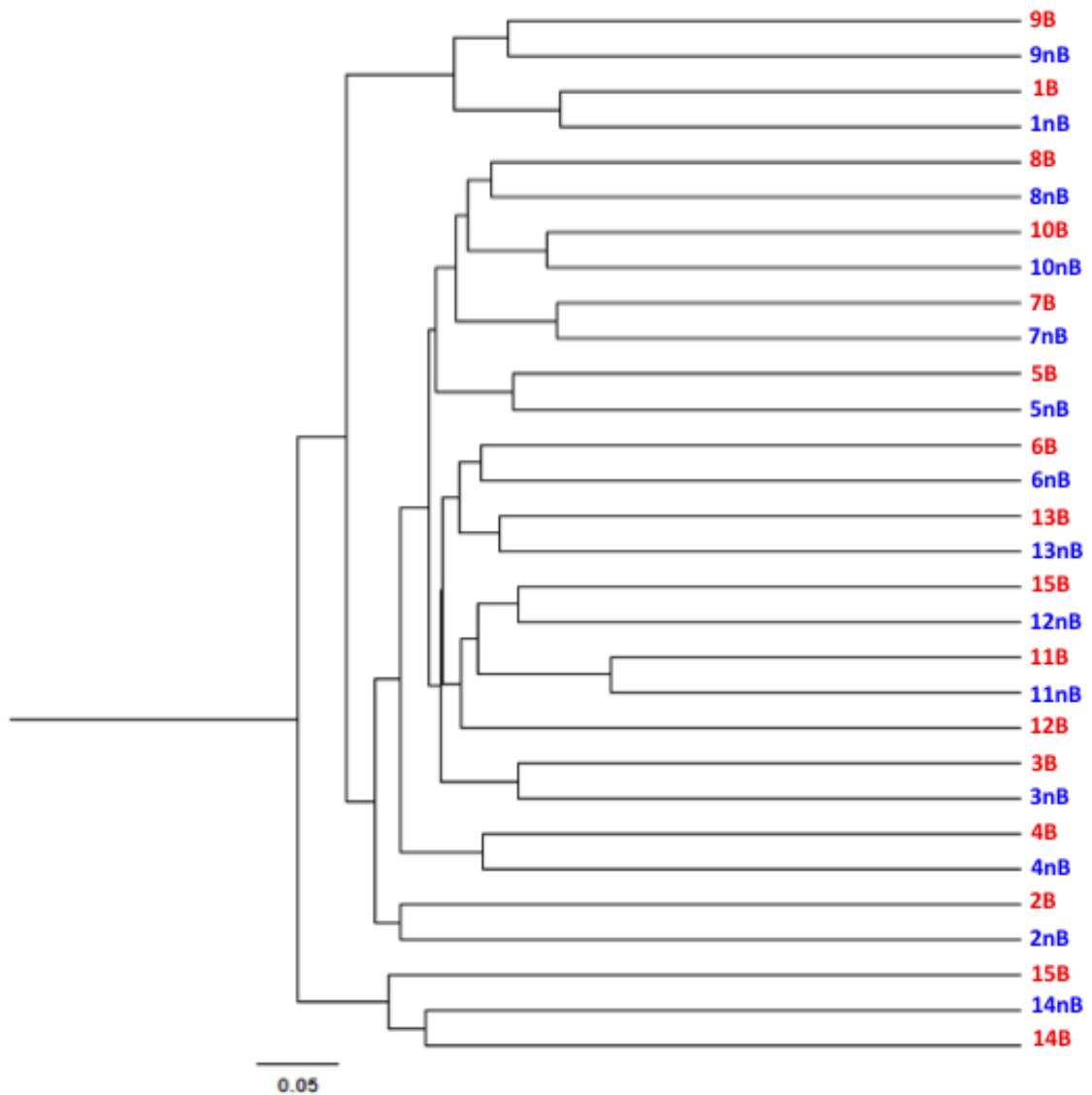


Figura 5. Dendrograma en base a Jaccard Index

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje
- A ambas letras les antecede el número de sujeto estudiado

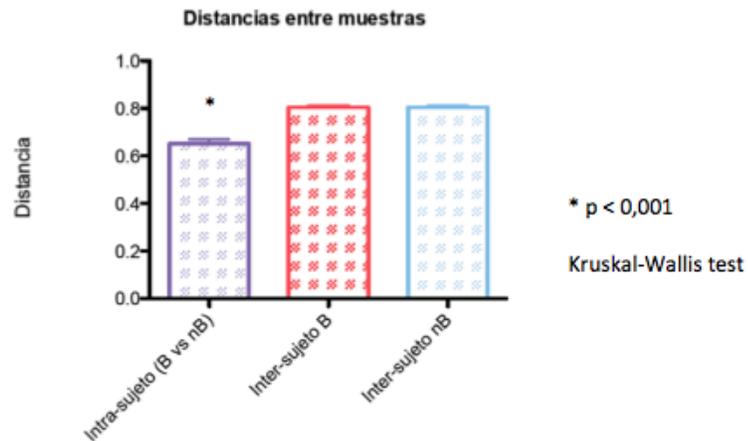


Figura 6. Distancias basadas en Jaccard Index

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

También se construyó un dendograma en base al Theta Index, que estima la disimilitud en la estructura de las comunidades en términos cuantitativos, por lo que considera las abundancias relativas de las distintas OTUs presentes en ambos grupos (figura 7). En este caso se volvió a utilizar el análisis de “weighted” y “unweighted UniFrac” y éstos nuevamente mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a este nivel ($p > 0,05$). Este dendograma fundamentalmente mostró nuevamente que el sangrado no fue el factor que determinó la distribución de

las muestras, sino que estas se agruparon sin un patrón definido, a diferencia del caso anterior, en el que el sujeto determinaba la proximidad de las comunidades microbianas. Por lo tanto, nuevamente se construyó un gráfico en base a las distancias expresadas en el dendograma (basado en Theta Index), evaluando la distancia de las muestras al interior de un sujeto, entre los sujetos en sitios con sangrado (B) y entre los sujetos en sitios sin sangrado (nB). En este gráfico (figura 8), se aprecia que la distancia entre la composición de las muestras al interior de un sujeto es similar a la distancia entre sujetos ($p > 0,001$, Kruskal Wallis test). De esto se desprende que cuando tomamos en cuenta los miembros de las comunidades y su abundancia relativa, no se pudo apreciar un determinante común que agrupara estas comunidades microbianas.

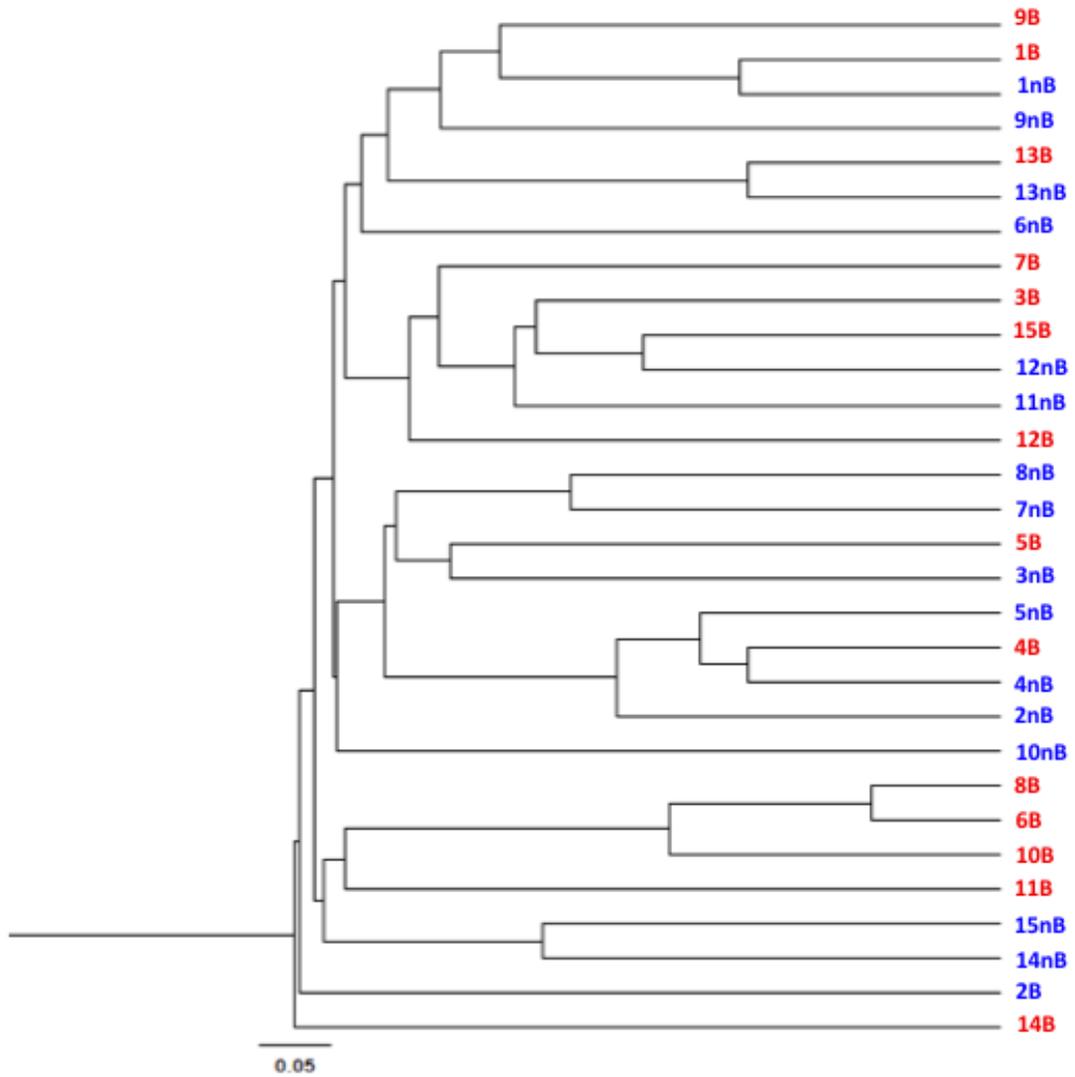


Figura 7. Dendrograma en base a Theta Index .

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje
- A ambas letras les antecede el número de sujeto estudiado

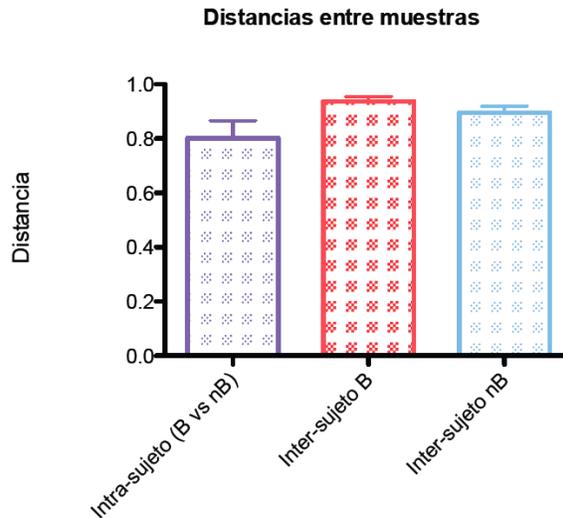


Figura 8. Distancias basadas en Theta Index

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

Otro método que se utilizó para analizar la disimilitud entre comunidades microbianas es el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), basado en los mismos coeficientes anteriormente señalados (Jaccard Index y Theta Index), que dan cuenta de la diferencia en los miembros y estructura de las comunidades, respectivamente. En las figuras 9 y 10 se observan ambos PCoA graficados, al análisis no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos estudiados (B y nB) utilizando AMOVA (test estadístico basado en el análisis de la varianza molecular). Por lo tanto,

podemos concluir de estos resultados, que el sangrado nuevamente no se comportó como un determinante que agrupara las comunidades microbianas estudiadas.

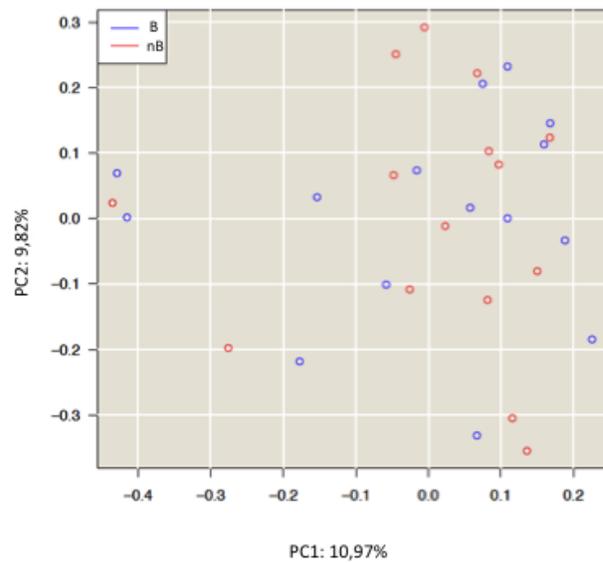


Figura 9. Análisis de Coordenadas Principales en base a Jaccard Index

- AMOVA ($p > 0,05$)

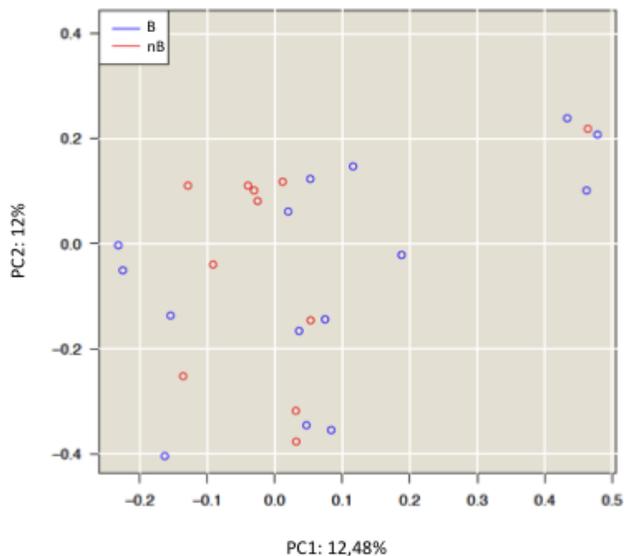


Figura 10. Análisis del Coordenadas Principales en base a Theta Index

- AMOVA ($p > 0,05$)

Continuando con la comparación de las comunidades microbianas, se analizaron las diferencias en relación a los miembros de las comunidades en distintos niveles taxonómicos. A nivel de OTUs, se analizaron aquellas diferencialmente representadas utilizando el método propuesto por White y cols. denominado “Metastats” (White et al., 2009). Utilizando ese análisis, se obtuvo 682 OTUs diferencialmente representadas en los grupos estudiados (con y sin sangrado) de un total de 1257 OTUs encontradas. Las diferencias se vieron fundamentalmente en aquellas OTUs menos abundantes, fundamentalmente en

aquellas con 5 secuencias o menos. En la figura 11, se aprecian las diferencias en las 25 OTUs más abundantes para ambos grupos y cuáles presentan diferencias estadísticamente significativas según metastats ($p < 0.0007$, corregido para comparaciones múltiples). Las OTUs diferencialmente representadas fueron *Treponema sp.* OT-237 y *Parvimonas micra* OT-111 aumentadas en el grupo sin sangrado; *Neisseria subflava* OT- 476 y *Enterobacter sakazakii* OT- 75, ambas aumentadas en el grupo con sangrado.

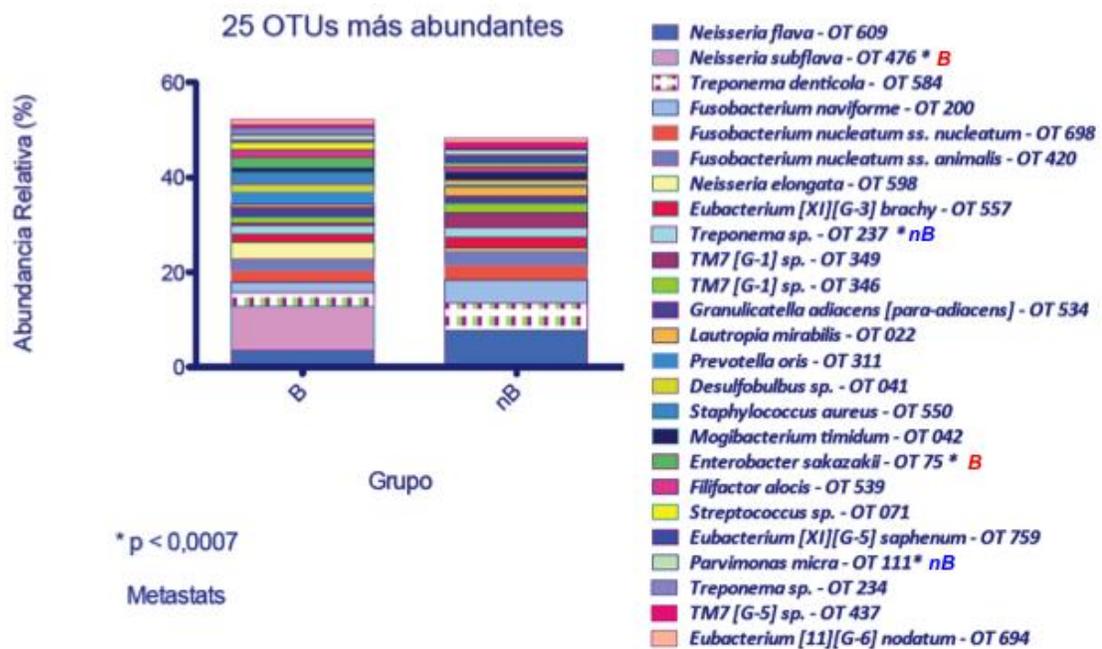


Figura 11. Gráfico de barras apiladas de las OTUs más abundantes en ambos grupos

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje
- OT: corresponde al "Oral Taxon Number", asignado en la HOMD.

A nivel de géneros bacterianos, hubo 94 géneros encontrados en total, en ambos grupos. En la figura 12, se observan los 25 géneros bacterianos más abundantes, dentro de ellos no hubo diferencias estadísticamente significativas en abundancia relativa ni en presencia o ausencia utilizando estadística tradicional ($p > 0,05$) (Wilcoxon Signed Rank Test y Test de McNemar, respectivamente). En cambio, utilizando Metastats se vió que existía un aumento de *Enterobacter*, *Acinetobacter* en las comunidades provenientes de muestras con sangrado y *Mogigabacterium* se encontró elevado en el grupo sin sangrado.

La figura 13, muestra las diferencias que hubo en la frecuencia de detección de géneros, independientemente de su abundancia relativa. Se aprecia nuevamente el género *Mogigabacterium*, además de los géneros *Anaeroglobus* y *Catonella*, que se encontraban aumentados en el grupo sin sangrado ($p < 0,05$) (Wilcoxon Signed Rank Test). Por otra parte, se encontraron diferencias en los géneros, *Propionibacterium*, *Haemophilus*, *Kocuria*, los ya revisados *Enterobacter* y *Acinetobacter*, utilizando el análisis de Metastats. A nivel de presencia, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en los géneros *Anaeroglobus* y *Catonella*, también con una mayor presencia en el grupo sin sangrado ($p < 0,05$) (Test de McNemar).

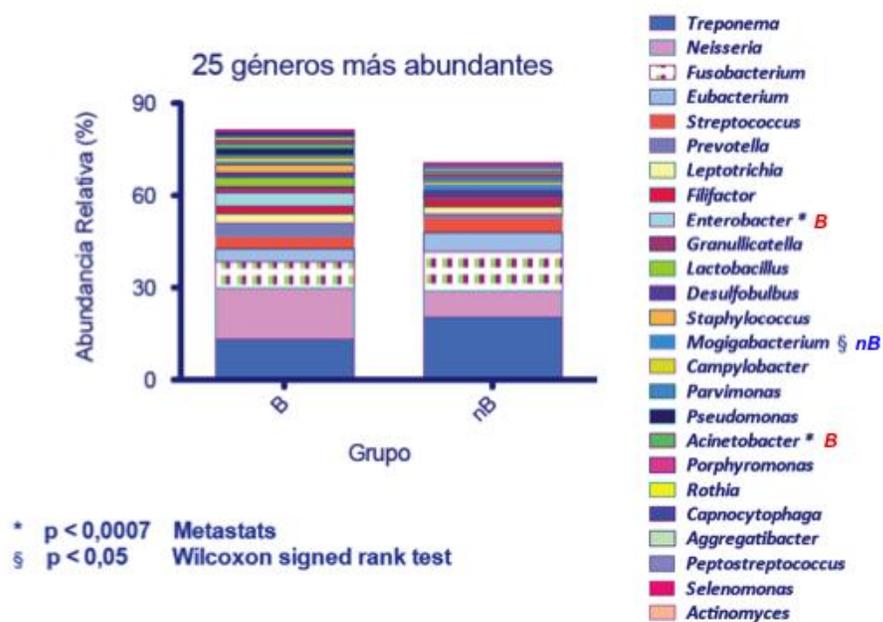


Figura 12.. Gráfico de barras apiladas de los Géneros más abundantes en ambos grupos

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje.

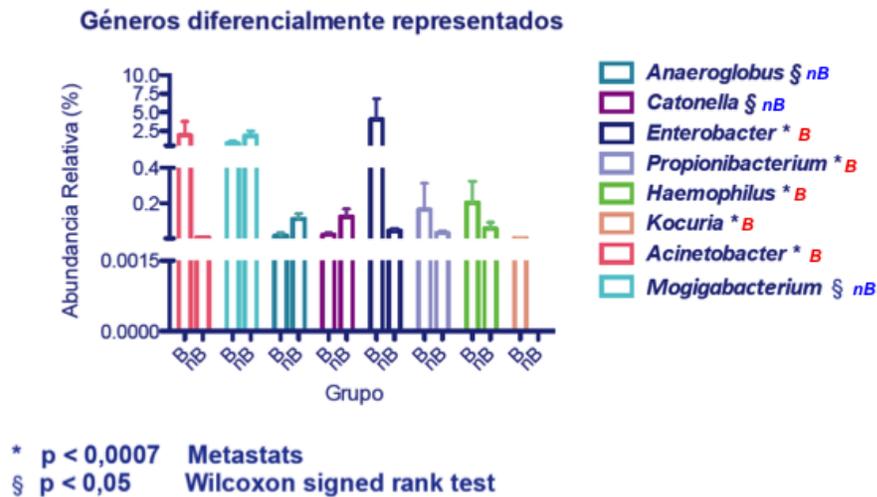


Figura 13. Gráfico de barras apiladas de los Géneros diferencialmente representados

- *B*, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- *nB*, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

A nivel de phylum, hubo microorganismos pertenecientes a 11 phyla diferentes en total. En las figuras 14 y 15, se aprecia la abundancia relativa de cada uno de ellos, separando el análisis por grupo (con y sin sangrado). En la figura 11 se muestran aquellos considerados por algunos autores como los phylum comúnmente encontrados (Common Phyla) y en la figura 12 se aprecian los que son considerados como phylum que raramente se detectan en el microbioma de la cavidad bucal (Rare Phyla) (Griffen et al., 2011). Se detectaron diferencias sólo a nivel del phylum Proteobacteria, que se encuentra aumentado en el grupo con sangrado ($p < 0,05$)(Wilcoxon Signed Rank Test).

En términos de presencia, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Test de McNemar).

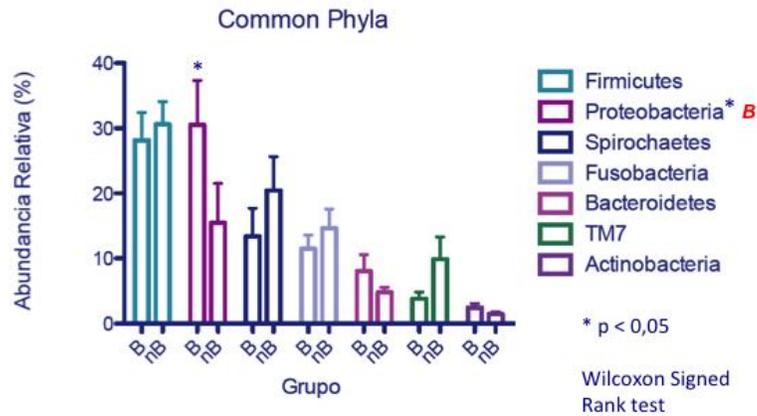


Figura 14. Gráfico de barras apiladas de los Phylum “comunes” en el microbioma bucal

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

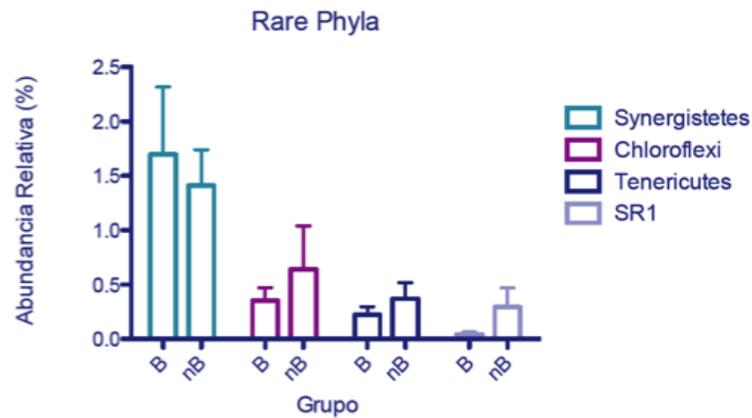


Figura 15. Gráfico de barras apiladas de los Phylum “raros” en el microbioma bucal

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

c) Análisis de la carga bacteriana total

Estos resultados corresponden a lo enunciado en el Objetivo Específico N°3, respecto a la cuantificación de la carga bacteriana total detectada en ambos grupos estudiados (con y sin sangrado al sondaje). El análisis de lo obtenido por qPCR mostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en la cantidad de carga bacteriana total, encontrándose aumentada en el grupo con sangrado, medida en número de copias del gen 16S rRNA, como se observa en la figura 16.

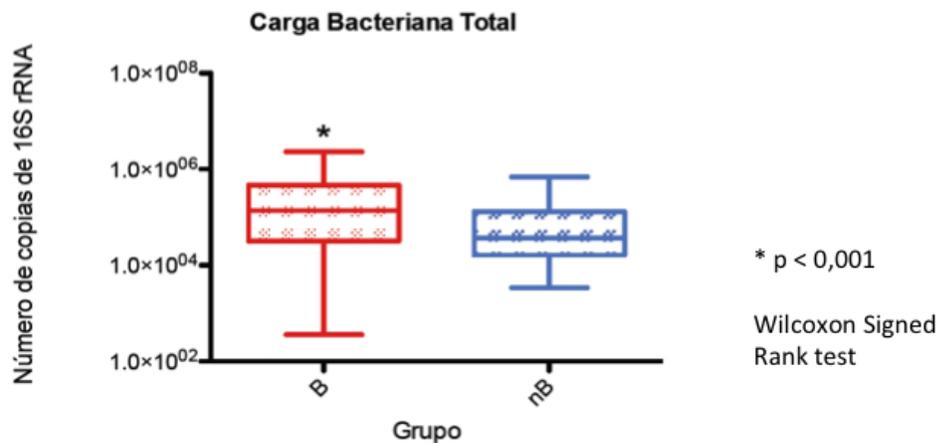


Figura 16. Carga Bacteriana Total, expresado en mediana y rango intercuartil.

- B, corresponde a muestras que presentaron sangrado al sondaje
- nB, corresponde a muestras sin sangrado al sondaje

Discusión

Históricamente, el microbioma subgingival ha sido caracterizado utilizando métodos de cultivo microbiológico clásico y técnicas moleculares enfocadas a la detección de microorganismos específicos usualmente vinculados con periodontitis. En el presente estudio, hemos utilizado amplificación de las regiones V1-V2 del gen 16SrRNA y high-throughput 454 pyrosequencing, permitiendo una caracterización completa del microbioma bacteriano subgingival en sitios con y sin sangrado al sondaje de pacientes con periodontitis crónica. Nuestro trabajo constituye una primera aproximación al microbioma subgingival en periodontitis crónica realizado en Chile utilizando este tipo de tecnología, lo cual ha permitido la identificación y enumeración de nuevos microorganismos que podrían estar asociados con esta patología. Al respecto, se afirma que es una aproximación al microbioma subgingival debido al número de sujetos estudiados (n=15), el cual pudiera parecer reducido. Sin embargo, si lo comparamos el número de individuos muestreados en los escasos estudios publicados que han tenido el objetivo de describir el microbioma subgingival, encontramos que el estudio que lo ha caracterizado más extensamente ha analizado a 31 individuos (Paster et al., 2001) y los otros trabajos al respecto tienen cantidades similares (n=15) (Shchipkova et al., 2010)

o inferiores (n=10) (Bik et al., 2010), (n=5) (Aas et al., 2005) y (n=1) (Kroes et al., 1999) de pacientes incluidos en la caracterización. A pesar de esto, reconocemos que es necesario contar con estudios que caractericen una mayor cantidad de sujetos, para lograr una descripción más completa del microbioma subgingival y que permita establecer perfiles bacterianos por sobre la variabilidad inter-individual.

Dentro de los parámetros de α – diversidad analizados, encontramos que la Riqueza total obtenida en las comunidades microbianas estudiadas fue de 1.257 OTUs, alcanzando un valor que es superior a lo proyectado en otros estudios (500 a 600 especies) realizados con amplificación y clonación del gen 16S rRNA en pacientes con periodontitis (Paster et al., 2001). Este aumento es esperable debido a la naturaleza de la técnica que ha demostrado una mejor cobertura en microorganismos de distintos nichos orales comparado con sanger sequencing (Li et al., 2010; Nasidze et al., 2009b). Sin embargo, estimaciones recientes han establecido que la riqueza total de la microbiota oral puede ascender a ≈ 1.200 especies (Jenkinson, 2011), lo que concuerda con lo encontrado en nuestro análisis. Además, la cobertura alcanzada fue mayor al 95% (calculada con Good's Coverage) por lo que pudimos apreciar casi la totalidad de las OTUs presentes en dichas comunidades. Por otra parte, si analizamos la riqueza obtenida y estimada en cada comunidad microbiana, se

observó que el sangrado al sondaje no fue un factor que determinara diferencias en la riqueza de cada muestra. No obstante, a nivel de “evenness” (uniformidad) de las comunidades, encontramos que las comunidades microbianas provenientes de sitios sin sangrado son más uniformes en su composición que las con sangrado. Las comunidades sin sangrado se encontraron dominadas por una mayor cantidad de especies, estas fueron *Fusobacterium spp.*, TM7 [G-1] OT 349 y 346, *Neisseria flava* OT – 609 y *Eubacterium brachy* [XI] [G-3] - OT 557, entre otras. La causa de la diferencia en la uniformidad en las comunidades sin sangrado, puede deberse a que en las comunidades de sitios con sangrado hay un cambio a nivel ecológico determinado por la presencia de inflamación. Dado lo anterior, existe una mayor disposición de nutrientes que determina un aumento de ciertas especies al interior del biofilm subgingival y de sus interacciones microbianas, favoreciendo el predominio de algunos miembros de la comunidad. En cambio, en las comunidades sin sangrado, existe una mejor repuesta y adaptación ante cambios súbitos de las condiciones medioambientales, ya que las interrelaciones metabólicas y de cooperación son sostenidas por una mayor proporción de las especies dentro de la composición de la comunidad (Wittebolle et al., 2009).

Con relación a la comparación de la diversidad en ambos tipos de comunidades (B y nB), se obtuvo que ambas presentaban un nivel de diversidad similar, medido con dos índices diferentes. Al respecto, autores (Bibiloni et al., 2006; Seksik et al., 2005) han encontrado al estudiar la microbiota asociada a la Enfermedad de Crohn y Colitis ulcerosa, que al comparar la diversidad entre comunidades microbianas provenientes de biopsias de mucosa intestinal con y sin inflamación, dichas comunidades presentan una diversidad similar medida con Shannon Index, estableciendo que la inflamación no fue un parámetro que alteró la diversidad, al igual que en el presente estudio. Sin embargo, es necesario señalar que la naturaleza y el tipo de microorganismos que forman parte de comunidades bacterianas provenientes de distintas zonas del cuerpo humano difieren entre sí y tienen un comportamiento particular (Costello et al., 2009), por lo cuál la comparación de la diversidad sería más válida en estudios realizados en la microbiota oral. A la fecha, no existen otros estudios que evalúen como influye la inflamación en la diversidad de las comunidades microbianas pertenecientes a la cavidad oral, por lo que nuestro trabajo constituye la primera aproximación para tratar de esclarecer dicha relación.

Por otro lado, los diferentes análisis realizados para evaluar la similitud cualitativa y cuantitativa a nivel global de las comunidades estudiadas,

mostraron que el sangrado no fue un factor que determinara la formación de grupos o “clusters” de las comunidades microbianas estudiadas. Este resultado se debió en parte a que la variabilidad entre sujetos fue mayor que la variabilidad entre los sitios con y sin sangrado. Las variaciones interindividuales en la microbiota oral, han sido descritas por diversos autores como Díaz. y cols. (Díaz et al., 2006), quienes mostraron en tres sujetos, que la colonización temprana del esmalte es sujeto-específica. Lazarevic y cols. (Lazarevic et al., 2010), en un estudio longitudinal realizado también en tres individuos, determinaron que las comunidades bacterianas salivales muestreadas en momentos diferentes se agrupan de acuerdo al sujeto del cual provenían. Por cuanto, la gran variabilidad interindividual, nos lleva a hipotetizar respecto a que los cambios de la composición microbiana en periodontitis, estarían más determinados por variaciones a nivel global que en el sitio periodontalmente afectado.

A pesar de no encontrarse grandes cambios en general, se detectaron diferencias entre ambos grupos estudiados fundamentalmente en aquellas OTUs menos abundantes (5 secuencias o menos), utilizando la herramienta de análisis para datos metagenómicos Metastats. Dentro de las 25 OTUs más abundantes, hubo 4 especies que estuvieron diferencialmente representadas, 2 en el grupo sin sangrado que fueron *Treponema spp.* – OT 237 y *Parvimonas*

micra OT-111 y 2 en el grupo con sangrado, que fueron *Enterobacter sakazakii* - OT 75 y *Neisseria subflava* - OT 476 . En general, las especies comprendidas al interior del género *Neisseria* han sido caracterizadas como microorganismos que se encuentran colonizando la cavidad oral en etapas tempranas de la vida y también las vías respiratorias (Garcia-Rodriguez and Fresnadillo Martinez, 2002). En varios estudios, se ha descrito al género *Neisseria* como uno de los géneros habitualmente encontrados en diversos nichos orales en sujetos sanos (Aas et al., 2005; Bik et al., 2010; Kroes et al., 1999), formando parte habitualmente de la microbiota de superficies mucosas, lengua y placa supragingival. Al respecto, uno de los estudios que ha analizado más exhaustivamente la microbiota oral en sujetos sanos, detectó la presencia de *N. bacilliformis* en el biofilm subgingival en sólo uno de los individuos estudiados. Interesantemente, en un estudio realizado por Páster y cols., estos autores encontraron *N. mucosa*, *N. polysaccharea*, *N. elongata*, *N. pharyngis*, *N. weaveri* y *N. flavescens*, presentes casi exclusivamente en pacientes con periodontitis refractaria al tratamiento (Paster et al., 2001). Además, hace algún tiempo, Newman & Socransky (Newman and Socransky, 1977), utilizando técnicas de cultivo microbiológico clásico, encontraron que el género *Neisseria* correspondía al 1,8% de la microbiota total cultivable en sujetos periodontalmente sanos y al 3% en individuos con periodontitis. Dichos

antecedentes, en conjunto con los aportados en el presente estudio, apuntan a una posible participación del género *Neisseria* en el biofilm subgingival asociado a periodontitis, describiendo una incipiente relación con signos clínicos inflamatorios de esta patología, como lo es el sangrado al sondaje.

Por otra parte, el género *Enterobacter*, no es uno de los géneros habitualmente identificados a nivel subgingival en periodontitis. Sin embargo, en la población chilena, se ha detectado una alta frecuencia de bacilos entéricos (17.6 %) en pacientes con periodontitis crónica (Herrera et al., 2008). Esto puede ser explicado fundamentalmente por la alta variabilidad geográfica descrita para este género y otros como *Serratia* (Nasidze et al., 2009a). Creemos que esa es la explicación más plausible, debido a que no existen antecedentes en la literatura que describan una participación en la patogénesis de la periodontitis por parte de los microorganismos pertenecientes al género *Enterobacter*, por lo que no podríamos caracterizar cuál sería la relación entre la presencia de sangrado y la mayor abundancia relativa de *E. sakazakii* OT-75.

A nivel de las OTUs diferencialmente representadas en los sitios sin sangrado, encontramos una especie no cultivable perteneciente al género *Treponema* (*Treponema* sp. OT – 237). Este género ha sido descrito como componente del biofilm subgingival fundamentalmente en sujetos con

periodontitis, encontrándose una gran cantidad y diversidad de especies (Asai et al., 2002; Paster et al., 2001). Por el contrario, estos microorganismos están presentes a nivel subgingival en individuos periodontalmente sanos, pero en una cantidad muy inferior comparada a la que se describe en periodontitis (Bik et al., 2010; Paster et al., 2001). Respecto al aumento de la abundancia relativa de esta especie de *Treponema* (OT-237) en sitios sin sangrado, en la literatura no hemos encontrado antecedentes, debido a que se debe a un microorganismo que no ha sido descrito en otros estudios, probablemente porque no ha sido cultivado. Sin embargo, por el contrario, se ha reportado que otros miembros del género *Treponema*, como *T. denticola* y *T. socranskii*, aumentaron significativamente en sitios con sangrado al sondaje, lo cual fue evaluado utilizando checkerboard DNA-DNA hybridization (Socransky and Haffajee, 2005). Cabe destacar que en dicho estudio no se controló por Profundidad al Sondaje, por lo cual no podemos afirmar que dicho resultado se deba sólo a la presencia o ausencia del signo sangrado al sondaje. Por otra parte, en otro estudio de Armitage y cols. (Armitage et al., 1982) utilizando microscopía de campo oscuro, encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de espiroquetas y varios parámetros clínicos, describiendo un mayor aumento en presencia de sangrado al sondaje y profundidad al sondaje mayor a 3 mm (Armitage et al., 1982). Por el contrario, Baab y cols. (Baab and Opsvig,

1986) utilizando microscopía de contraste de fases, encontraron que no hubo diferencias respecto a la proporción de espiroquetas en sitios con y sin sangrado al sondaje, en sitios con profundidad al sondaje entre 4 a 6 mm (Baab and Opsvig, 1986). Respecto a los resultados obtenidos en esta investigación, el aumento de dicha especie de *Treponema* (OT- 237) en los sitios sin sangrado debe ser interpretado con cautela, ya que tampoco representó lo que sucede a nivel de género, en donde al igual que el estudio recientemente citado de Baab y cols., no se encontraron diferencias entre sitios con y sin sangrado.

En cuanto al aumento de *Parvimonas micra* – OT 111 en los sitios sin sangrado, podemos decir que es uno de los microorganismos que habitualmente se encuentra en sitios con periodontitis crónica en pacientes chilenos, teniendo una frecuencia de detección del 29,7% (Herrera et al., 2008). Aparentemente, no existe evidencia en la literatura que demuestre alguna asociación de este microorganismo con parámetros clínicos periodontales como sangrado al sondaje.

En la literatura, de acuerdo a investigaciones realizadas por otros autores (Socransky et al., 1998; Socransky and Haffajee, 2005), se han descrito algunas diferencias a nivel de especies en sitios con y sin sangrado al sondaje, que no han sido detectadas en nuestro estudio. Es el caso de las especies del complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*), las cuales en los

estudios de Socransky y cols. recientemente citados se encuentran aumentadas en los sitios con sangrado al sondaje, aunque estas asociaciones también se pueden deber a la profundidad del saco periodontal. En nuestro estudio, no encontramos diferencias a nivel de la abundancia relativa y de presencia en sitios los sitios con sangrado de estas especies. Cabe destacar que en el caso de *P. gingivalis* y *T. forsythia*, fueron detectadas en nuestro estudio, pero no aparecieron dentro de las 25 analizadas en el gráfico debido a su baja abundancia relativa. No obstante, cuando revisamos sólo la prevalencia de especies obtenidas, ambas especies se encontraron presentes en el 80% de los individuos estudiados, aunque como ya señalamos anteriormente no hubo diferencias entre los sitios con y sin sangrado. Estos resultados pueden deberse fundamentalmente al tipo de sitio estudiado, con una profundidad al sondaje fijada en 5 mm, los que pueden ser considerados sacos periodontales de mediana profundidad. Esto es importante debido a que Socransky y cols. (Socransky et al., 1998) han descrito que existe una mayor colonización de *P. gingivalis* en sitios con profundidades mayores a 7 mm, fenómeno que explicaría la baja abundancia relativa obtenida en nuestro estudio.

Dentro de las diferencias encontradas en la composición microbiana a nivel de género, tenemos que existe un aumento de los géneros *Enterobacter* (ya revisado), *Acinetobacter* en los sitios con sangrado y del género

Mogigabacterium en los sitios que no presentaron sangrado al sondaje. Al respecto, el género *Acinetobacter* ha sido descrito como parte del biofilm subgingival en pacientes con periodontitis refractaria al tratamiento (Colombo et al., 2009; da Silva-Boghossian et al., 2011; Paster et al., 2001) y no se les considera como microorganismos habituales de la cavidad oral, ya que generalmente participan de infecciones nosocomiales y son multi-resistentes a antimicrobianos (Bhargava et al., 2010). El aumento del género *Acinetobacter* en los sitios con sangrado abre nuevas posibilidades de investigación respecto a la participación de este género en periodontitis crónica y su vinculación con el aumento de la inflamación a nivel periodontal, además del rol ecológico que estaría cumpliendo en dichas comunidades microbianas.

El género *Mogigabacterium* ha sido fundamentalmente descrito en pacientes con periodontitis por algunos autores (Colombo et al., 2009; Paster et al., 2001; Tanner et al., 2007), pero aún se desconoce cuál es su participación en el biofilm subgingival como patógeno periodontal putativo, por lo que su aumento en sitios sin sangrado no tiene una interpretación clara aún. Otras diferencias encontradas a nivel de géneros poco abundantes, fueron a nivel de los géneros *Anaeroglobus* y *Catonella* en los sitios sin sangrado. Ambos han sido encontrados fundamentalmente en sujetos periodontalmente sanos (Bik et al., 2010; Paster et al., 2001), debido a esto podríamos especular que ciertas

condiciones medioambientales en esos sitios, como una disminución de la inflamación en este caso, propiciaron el aumento de dichas especies poco abundantes en el biofilm subgingival.

Respecto a las diferencias en géneros poco abundantes en los sitios con sangrado, encontramos un aumento en *Propionibacterium*, que ha sido frecuentemente descrito en periodontitis (Paster et al., 2001), también en *Haemophilus*, el cual ha sido detectado en periodontitis refractaria al tratamiento (Paster et al., 2001) y en salud periodontal (Bik et al., 2010). Hasta la fecha, el género *Kocuria*, no había sido descrito en placa bacteriana subgingival, solamente se había reportado en lesiones avanzadas de Noma (“cancrum oris”) (Paster et al., 2002) por lo que su detección en los sitios con sangrado es un nuevo aporte al conocimiento del microbioma subgingival, que ha sido posible debido al buen poder de resolución de la técnica utilizada para esta caracterización.

A nivel de phylum, el único que se encuentra diferencialmente representado, es el *Proteobacteria*, en las comunidades microbianas provenientes de sitios con sangrado al sondaje. La razón de esta diferencia es probablemente el aumento de los géneros *Enterobacter* y *Acinetobacter*, que se encontraron dentro de los 25 más abundantes y el aumento del género *Haemophilus*, los cuales pertenecen al phylum *Proteobacteria*. En dicho phylum

se encuentran sólo bacterias Gram-negativas, las cuales presentan una amplia diversidad metabólica y de requerimientos de oxígeno, constituyendo el phylum más extenso del dominio Bacteria (Gupta, 2000). Algunos microorganismos de este phylum han sido considerados patógenos periodontales como es el caso de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y patógenos periodontales putativos como *Campylobacter rectus* (Socransky et al., 1998). Además, este phylum es uno de los más abundantes del microbioma subgingival, independientemente del estado periodontal, en ambas condiciones (salud – periodontitis), al igual que el phylum *Firmicutes* (Bik et al., 2010; Kumar et al., 2005).

Por otra parte, hubo un aumento de la carga bacteriana total presente en los sitios con sangrado al sondaje, ya que la influencia de la inflamación en esas comunidades microbianas, determinó una mayor cantidad de bacterias a nivel del microbioma subgingival en los pacientes estudiados. Este resultado está en acuerdo con lo descrito por Socransky y cols. (Socransky et al., 1991), que encontraron un aumento estadísticamente significativo en la microbiota total cultivable de sitios con sangrado al sondaje. Se ha propuesto que la explicación de este fenómeno reside fundamentalmente en el íntimo contacto del biofilm subgingival con el fluido gingival crevicular, que se encuentra aumentado producto de la inflamación, creándose un microambiente necesario para el

sobre-crecimiento de los microorganismos; los cuáles una vez establecidos promoverían una mayor inflamación a nivel de los tejidos periodontales, estableciéndose una relación bi-direccional entre el estado inflamatorio y la composición del microbioma (Socransky and Haffajee, 2005; Tanner et al., 2007).

Conclusiones

Del presente estudio se pudo concluir , en distintos niveles de análisis:

a) Parámetros de α – diversidad:

- Se analizaron 109.861 secuencias obteniéndose un total de 1257 OTUs.
- No se encontraron diferencias entre las comunidades de ambos grupos estudiados a nivel de riqueza observada y estimada
- En las comunidades microbianas del grupo sin sangrado, la abundancia de las especies que conforman la comunidad es más uniforme que en las comunidades con sangrado, en donde algunas especies dominan la composición de la comunidad.
- En ambos grupos estudiados, las comunidades microbianas presentaron similar diversidad de especies, evidenciada a través de distintos índices.

b) Estructura y composición de las comunidades

- Los análisis del componente principal (PCoA) de Jaccard Index y Theta Index, revelaron que no hubo determinantes comunes que llevaran a agrupaciones según los grupos estudiados (B y nB).

c) Variabilidad entre los sujetos

- El análisis del dendograma basado el Jaccard Index, reveló que las distancias eran menores si comparáramos los sitios entre un mismo sujeto, que si lo hacíamos inter-sujeto. A su vez, el análisis basado en el Theta Index mostró la misma tendencia sin llegar a ser estadísticamente significativa.

c) Diferencias en distintos niveles taxonómicos

- Entre las OTU más abundantes, se encontraron 4 OTUs diferencialmente representadas, *E. sakazakii* OT - 75 y *N. subflava* OT - 476 en sitios con sangrado. Una especie aún no cultivada de Treponemas (OT - 237) y *P. micra* OT - 111 están aumentadas en los sitios sin sangrado. Además, se encontró una gran cantidad de diferencias en OTUs de menor abundancia.
- A nivel de género, se encontraron 8 diferencialmente representados. En los sitios con sangrado se encontraron aumentados los géneros *Enterobacter*, *Propionibacterium*, *Haemophilus*, *Kocuria* y *Acinetobacter*. Mientras que en los sitios sin sangrado están aumentados los géneros *Anaeroglobus*, *Catonella* y *Mogigabacterium*.

- A nivel de Phylum, sólo se encontró aumentado el *Proteobacteria* en los sitios con sangrado.

d) Comparación de la carga bacteriana total

- Se encontró un aumento de la carga bacteriana total en los sitios con sangrado al sondaje, en comparación con los sitios que no presentaban dicho signo clínico.

Conclusión final

La presencia de inflamación medida por sangrado al sondaje esta asociada a un aumento en el número de bacterias presentes en el microbioma subgingival y aparentemente podría estar vinculada con diferencias menores a nivel de la composición microbiana.

Los perfiles bacterianos obtenidos en este estudio no fueron determinados por la presencia o ausencia de inflamación, sino más bien por el individuo del cual provenían. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que los cambios en el microbioma subgingival durante la periodontitis crónica son el resultado de una perturbación global en la ecología bacteriana de la cavidad oral y no tendrían su origen en un desbalance sitio-específico.

Sugerencias

La tecnología utilizada en este trabajo (*454 high-throughput pyrosequencing*) ha demostrado ser un gran aporte en la caracterización del microbioma subgingival. Creemos que sería de mucha utilidad evaluar por medio de esta técnica la influencia de otros factores que inciden en la composición bacteriana en periodontitis crónica, como la profundidad al sondaje. Resultaría muy interesante apreciar los cambios del microbioma subgingival conforme va cambiando la profundidad al sondaje y la relación de otros parámetros clínicos, que pueden ayudar a una mejor comprensión de los cambios asociados a la microbiota subgingival en periodontitis.

Resumen

La periodontitis es una enfermedad originada por cambios a nivel del microbioma subgingival y su interacción con la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero, produciéndose como resultado la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente. Por tanto, durante este proceso la inflamación juega un rol esencial, por lo cual nuestro objetivo fue evaluar la influencia de la inflamación, evidenciada a través del signo clínico “Sangrado al Sondaje” (BOP) en la composición y cantidad del microbioma subgingival en sitios con periodontitis. Se tomaron dos muestras de placa bacteriana subgingival por sujeto estudiado (n=15), con y sin presencia BOP, con igual “Profundidad al Sondaje”, que fue fijada previamente en 5 mm. Para la caracterización del microbioma se utilizó piro-secuenciación 454 de los amplicones generados por PCR para las regiones V1-V2 del gen 16S rRNA y PCR en tiempo real. En cuanto a la composición de estas comunidades microbianas, se obtuvieron 109.860 secuencias de ~ 180 bp de longitud y se alcanzó una cobertura de alrededor del 98% en todas las muestras. No hubo diferencias en la diversidad de las comunidades con y sin sangrado, sin embargo la abundancia de las especies provenientes de las muestras sin sangrado se distribuyeron de manera más homogénea que las con sangrado. Respecto a la riqueza encontrada, identificamos 1.257 OTUs (Unidades Operacionales Taxonómicas)

definidas al 97% de similitud. Dentro de las OTUs más abundantes diferencialmente representadas entre ambas condiciones, encontramos a *Enterobacter sakazakii* OT - 75 y *Neisseria subflava* OT - 476 en sitios con sangrado. Una especie aún no cultivada de Treponemas (OT - 237) y *Parvimonas micra* OT - 111 están aumentadas en los sitios sin sangrado. Además, se encontró una gran cantidad de diferencias en OTUs de menor abundancia. A nivel de género éstas diferencias sólo se reflejaron en 8 de un total de 94 géneros bacterianos encontrados. El phylum Proteobacteria, se encuentra aumentado en el microbioma de sitios con BOP, al igual que la carga bacteriana total. Como conclusión, establecemos que la presencia de inflamación favorece el aumento bacterias presentes en el microbioma subgingival y aparentemente podría estar vinculada sólo con diferencias menores a nivel de la composición microbiana.

Bibliografía

1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. (1999). *Ann Periodontol* 4(1).i, 1-112.

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43(11):5721-5732.

Ainamo J, Bay I (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International dental journal* 25(4):229-235.

Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW (1982). Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *Journal of periodontology* 53(9):550-556.

Armitage GC (1995). Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 7(39-53).

Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4(1):1-6.

Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T (2002). Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 40(9):3334-3340.

Baab DA, Opsvig EJ (1986). Subgingival microflora in bleeding and nonbleeding pockets. *Journal of clinical periodontology* 13(8):795-798.

Badersten A, Nilveus R, Egelberg J (1985). Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. *J Clin Periodontol* 12(6):432-440.

Bentley G, Higuchi R, Høglund B, Goodridge D, Sayer D, Trachtenberg EA *et al.* (2009). High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens* 74(5):393-403.

Bhargava N, Sharma P, Capalash N (2010). Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol* 36(4):349-360.

Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW (2006). The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of medical microbiology* 55(Pt 8):1141-1149.

Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF *et al.* (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME journal* 4(8):962-974.

Borrell LN, Burt BA, Taylor GW (2005). Prevalence and trends in periodontitis in the USA: the [corrected] NHANES, 1988 to 2000. *J Dent Res* 84(10):924-930.

Bunge J (2011). Estimating the number of species with catchall. *Pac Symp Biocomput*:121-130.

Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 24(6):469-477.

Chao A., Hwang W-H., Chen YC & Kuo, CY (2000). Estimating the number of shared species in two communities. *Stat Sinica* 10, 227-246

Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE (2010a). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for

investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)* 2010(baq013).

Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE (2010b). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database : the journal of biological databases and curation* 2010(baq013).

Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM *et al.* (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research* 33(Database issue):D294-296.

Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD *et al.* (2009). Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *Journal of periodontology* 80(9):1421-1432.

Contreras M, Costello EK, Hidalgo G, Magris M, Knight R, Dominguez-Bello MG (2010). The bacterial microbiota in the oral mucosa of rural Amerindians. *Microbiology* 156(Pt 11):3282-3287.

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326(5960):1694-1697.

da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP (2011). Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 56(9):899-906.

Demmer RT, Papapanou PN, Jacobs DR, Jr., Desvarieux M (2008). Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. *J Clin Periodontol* 35(6):479-486.

Demmer RT, Papapanou PN (2010). Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 53(28-44).

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Jr. *et al.* (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and environmental microbiology* 72(4):2837-2848.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27(16):2194-2200.

Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, Borgnakke WS, Dye BA (2010). Accuracy of NHANES periodontal examination protocols. *J Dent Res* 89(11):1208-1213.

Engelberger T, Hefti A, Kallenberger A, Rateitschak KH (1983). Correlations among Papilla Bleeding Index, other clinical indices and histologically determined inflammation of gingival papilla. *Journal of clinical periodontology* 10(6):579-589.

Gabriel C, Danzer M, Hackl C, Kopal G, Hufnagl P, Hofer K *et al.* (2009). Rapid high-throughput human leukocyte antigen typing by massively parallel pyrosequencing for high-resolution allele identification. *Hum Immunol* 70(11):960-964.

Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Munoz A, Urzua I, Aranda W *et al.* (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol* 81(10):1403-1410.

Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ (2002). Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 50 Suppl S2(59-73).

Garnick JJ, Silverstein L (2000). Periodontal probing: probe tip diameter. *Journal of periodontology* 71(1):96-103.

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ *et al.* (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3(9):733-739.

Greenstein G, Caton J, Polson AM (1981). Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. *Journal of periodontology* 52(8):420-425.

Good IJ. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237-264.

Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, Difrancio JM, Hardman JH *et al.* (2011). CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One* 6(4):e19051.

Gupta RS (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 24(4):367-402.

Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G *et al.* (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 21(3):494-504.

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N *et al.* (2008). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of clinical periodontology* 35(2):106-113.

Hugoson A, Norderyd O (2008). Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl):338-345.

Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* 12(7):1889-1898.

Jaccard, Paul (1901), "Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura", *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **37**: 547–579.

Jenkinson HF (2011). Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* (epub).

Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC *et al.* (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* **87**(11):1016-1020.

Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V *et al.* (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** Suppl 1(4592-4598).

Kornman KS (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* **79**(8 Suppl):1560-1568.

Kroes I, Lepp PW, Relman DA (1999). Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25):14547-14552.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ (2005). Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* **43**(8):3944-3955.

Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL (2006). Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* **44**(10):3665-3673.

Lamont RJ, Jenkinson HF (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4):1244-1263.

Lang NP, Nyman S, Senn C, Joss A (1991). Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J Clin Periodontol* 18(4):257-261.

Lank SM, Wiseman RW, Dudley DM, O'Connor DH (2010). A novel single cDNA amplicon pyrosequencing method for high-throughput, cost-effective sequence-based HLA class I genotyping. *Hum Immunol* 71(10):1011-1017.

Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, Francois P, Schrenzel J (2010). Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics* 11(523).

Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS *et al.* (2007). Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 73(2):516-523.

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124(4):837-848.

Li L, Hsiao WW, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongodin EF, Paster BJ *et al.* (2010). Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *Journal of dental research* 89(9):980-984.

Loe H, Silness J (1963). Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand* 21(533-551).

Lloyd M and Ghelardi, RJ. (1964) A table and calculating the "equitability" component of species diversity. *J Anim Ecol* 3; 217-255.

Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 73(5):1576-1585.

Lozupone CA, Knight R (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev* 32(4):557-578.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376-380.

Moore WE, Moore LV (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000* 5(66-77).

Muhlemann HR, Son S (1971). Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta* 15(2):107-113.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148(Pt 1):257-266.

Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M (2009a). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 19(4):636-643.

Nasidze I, Quinque D, Li J, Li M, Tang K, Stoneking M (2009b). Comparative analysis of human saliva microbiome diversity by barcoded pyrosequencing and cloning approaches. *Anal Biochem* 391(1):64-68.

Newman MG, Socransky SS (1977). Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *Journal of periodontal research* 12(2):120-128.

Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD (2007). Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol* 78(10):1911-1925.

Page RC, Eke PI (2007). Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology* 78(7 Suppl):1387-1399.

Pallen MJ, Loman NJ, Penn CW (2010). High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges. *Curr Opin Microbiol* 13(5):625-631.

Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP (2010). Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis* 16(2):136-145.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA *et al.* (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12):3770-3783.

Paster BJ, Falkler Jr WA, Jr., Enwonwu CO, Idigbe EO, Savage KO, Levanos VA *et al.* (2002). Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. *Journal of clinical microbiology* 40(6):2187-2191.

Paster BJ, Dewhirst FE (2009). Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000 51(38-44).

Polson AM, Greenstein G, Caton J (1981). Relationships between epithelium and connective tissue in inflamed gingiva. *Journal of periodontology* 52(12):743-746.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J *et al.* (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research* 35(21):7188-7196.

Rahardjo A, Yoshihara A, Amarasena N, Ogawa H, Nakashima K, Miyazaki H (2005). Relationship between bleeding on probing and periodontal disease progression in community-dwelling older adults. *J Clin Periodontol* 32(11):1129-1133.

Rajendhran J, Gunasekaran P (2011). Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166(2):99-110.

Ramfjord SP (1967). The Periodontal Disease Index (PDI). *Journal of periodontology* 38(6):Suppl:602-610.

Rescala B, Rosalem W, Jr., Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS *et al.* (2010). Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *Journal of periodontology* 81(9):1308-1316.

Robinson CJ, Bohannon BJ, Young VB (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74(3):453-476.

Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y (2004). Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol* 53(Pt 6):563-571.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y (2005). Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res* 40(3):277-285.

Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I (2009). A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *J Clin Periodontol* 36(6):458-467.

Schloss PD, Handelsman J (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology* 71(3):1501-1506.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23):7537-7541.

Schloss PD, Westcott SL (2011). Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and environmental microbiology* 77(10):3219-3226.

Seksik P, Lepage P, de la Cochetiere MF, Bourreille A, Sutren M, Galmiche JP *et al.* (2005). Search for localized dysbiosis in Crohn's disease ulcerations by temporal temperature gradient gel electrophoresis of 16S rRNA. *Journal of clinical microbiology* 43(9):4654-4658.

Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS (2010). Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res* 89(11):1247-1253.

Silness J, Loe H (1964). Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta odontologica Scandinavica* 22(121-135).

Simpson, E. H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163, 688

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S (1991). Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 18(10):766-775.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2):134-144.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD (2002). Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 29(3):260-268.

Socransky SS, Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38(135-187).

Sundquist A, Bigdeli S, Jalili R, Druzin ML, Waller S, Pullen KM *et al.* (2007). Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. *BMC Microbiol* 7(108).

Tanner AC, Kent R, Jr., Kanasi E, Lu SC, Paster BJ, Sonis ST *et al.* (2007). Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *J Clin Periodontol* 34(11):917-930.

Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S *et al.* (2010). Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *Journal of periodontology* 81(1):89-98.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* 73(16):5261-5267.

White JR, Nagarajan N, Pop M (2009). Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput Biol* 5(4):e1000352.

Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K *et al.* (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458(7238):623-626.

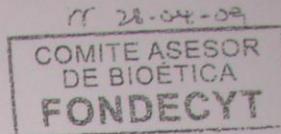
Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 27(9):648-657.

Yue, J. C., and M. K. Clayton. 2005. A similarity measure based on species proportions. *Commun. Stat. Theor. Methods* 34:2123–2131.

Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 9(259).

Anexo nº1





Las muestras de sangre periférica y de fluido gingival crevicular, normalmente no se toman a los pacientes que se someten a tratamiento periodontal, pero la información que estos exámenes pueden entregar son de mucha utilidad, para conocer la biología la infección periodontal.

Los sujetos sin periodontitis, son voluntarios, a los cuales producto de la extracción de los terceros molares, se les procederá a tomar una muestra de tejido gingival, y de fluido gingival crevicular.

Todos los procedimientos de toma de muestras son sin costo para los pacientes y sin costo para los sujetos sanos, sin periodontitis

Para el éxito del tratamiento periodontal es necesario hacer controles periódicos, con el objetivo de controlar la placa supragingival, de tal manera que se harán controles a los 3, 6 y 12 meses después del tratamiento periodontal.

Todas las muestras se almacenarán en un congelador menso 80 grados, hasta realizar los análisis correspondientes.

Todas las muestras biológicas tomadas en el presente estudio (biopsia, fluido gingival crevicular) solo se usarán en el presente estudio. Lo usual es que la cantidad de muestras tomadas solo alcanza para hacer los análisis correspondientes, siendo imposible poder guardar algo de material biológico.

Ventajas de participar en el estudio

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les hará entrega de todos los elementos necesarios para el higiene bucal (cepillo dentario, cepillo interproximal, seda y enjuagatorios).

Otra ventaja es que se les dará a conocer y se consignara en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

En relación con el tratamiento periodontal, en el tratamiento realizado por el suscrito, se hará una rebaja de un 50% del arancel que la Facultad tiene dispuesto cobrar para tales efectos.

A los pacientes sanos, se les regalará un set de higiene bucal.

Desventajas de participar el estudio

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma de una biopsia (realizada durante la misma sesión del tratamiento y por tanto se hace con anestesia), de fluido gingival crevicular (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente) y una muestra de sangre periférica tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología.

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Jorge Gamonal, son: 9781839, 9781838, y 2324232

Declaro

Heber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he plantado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mí entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el

13
28-04-09

Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Omar Campos, en el fono: 9781702.

Además se me ha aclarado, que en caso de no dar mi consentimiento, el profesional procederá de todas maneras a realizar el mencionado tratamiento periodontal.

Identificación Paciente

Nombre:

Rut:

Fono:

Identificación Dentista

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma

Firma

Fecha:

Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903.

93
[Handwritten signature]

