



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**  
**ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**  
**ORAL**

**“Interrelación entre el microbioma subgingival y las respuestas mediadas por células Th17 durante periodontitis experimental”**

**Estefanía Elizabeth Ximena Moreno Pino**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Asociada Loreto Abusleme Ramos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asociado Nicolás Dutzan Muñoz**

**Prof. Asistente Marion Arce Paniagua**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT 11180505, 1231728, 1231350**  
**Santiago - Chile**  
**2024**





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**  
**ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**  
**ORAL**

**“Interrelación entre el microbioma subgingival y las respuestas mediadas por células Th17 durante periodontitis experimental”**

**Estefanía Elizabeth Ximena Moreno Pino**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Asociada. Loreto Abusleme Ramos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asociado Nicolás Dutzan Muñoz**

**Prof. Asistente Marion Arce Paniagua**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT 11180505, 1231728, 1231350**  
**Santiago – Chile**

2024

## DEDICATORIA

*A mis padres que me acompañaron en cada paso de este camino, dándome incluso lo que no tenían para mi crianza sentando así la base de lo que soy hoy en día. En especial, a mi madre que sin falta me entregaba las palabras de aliento necesarias para seguir siempre acompañado con su amor eterno.*

*A mi hermano, Mario quien fue mi guía y ejemplo a seguir hasta el día de hoy. Sé que lo serás también para Marcel.*

*A Eduardo, mi mejor amigo y pareja, por ser mi persona incondicional en todo momento.*

*A mi familia, en especial a mis tíos, nana y primos, por su apoyo durante toda la vida.*

*También a mis mejores amigas, Gisell y Vanessa, sin ustedes la carrera hubiera estado cuesta arriba.*

*A mis docentes, de quienes aprendí y me llevo lo mejor de esta carrera.*

*A todos ellos, gracias totales.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Loreto Abusleme, mi tutora principal, por su continuo apoyo, dedicación y entrega durante este trabajo de investigación, siendo además de una excelente docente una gran persona.

A la Dra. Marion Arce y al Dr. Dutzan, mis tutores asociados, por ser parte de este proceso mediante la entrega de herramientas y nuevos conocimientos.

Al Laboratorio de Microbiología e Inmunología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

A los Proyecto FONDECYT 11180505, 1231728, 1231350.

A la Universidad de Chile, docentes y funcionarios.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
METODOLOGÍA.....	13
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS Y APÉNDICES.....	47

## RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que se encuentra asociada con un microbioma disbiótico que desencadena una respuesta inmuno-inflamatoria local desregulada y produce una destrucción de los tejidos periodontales. En este contexto los linfocitos Th17, principales productores de IL-17A aumentan en proporción y están asociados a la resorción ósea durante periodontitis. Sin embargo, se desconoce la influencia e interrelación del eje Th17/IL-17 sobre el microbioma subgingival.

**Objetivo:** Evaluar la correlación entre la abundancia relativa de algunas Unidades Operacionales taxonómicas (OTUs) específicas y la expresión de genes asociados a células Th17, junto con la carga bacteriana total del microbioma asociado al transcurso de periodontitis experimental.

**Metodología:** Se obtuvieron muestras microbiológicas y de tejido gingival de ratones C57BL/6 a los que se indujo periodontitis mediante ligadura, las cuales se retiraron a las 2 horas y días 1, 3, 5, 7 posterior a su colocación. Se extrajo el ADN y se caracterizó el microbioma de la ligadura por medio de secuenciación masiva basada en el gen 16S ADNr, para la obtención de OTUs, analizando su diversidad, y abundancia relativa, utilizando el software mothur. Posteriormente se estudió la covariación de los datos del microbioma, carga bacteriana total y expresión de genes *Rorc* e *Il17a* mediante el paquete mixOmics usando el software R.

**Resultados:** Se obtuvo que un grupo de OTUs, identificadas como *Escherichia* spp., poseen una correlación positiva con carga bacteriana y expresión de genes asociados con las células Th17 (*Il17a* y *Rorc*).

**Discusión:** El aumento de la abundancia relativa de ciertas OTUs asociadas con pérdida ósea durante periodontitis experimental, se correlaciona positivamente con el aumento en la expresión de *Il17a*, sugiriendo que la inflamación mediada por células Th17 podría incidir en la generación de disbiosis del microbioma asociado a la periodontitis experimental.

**Conclusión:** Existe una correlación positiva entre *Escherichia* spp. y la expresión de genes asociados con las células Th17, junto con la carga bacteriana total del microbioma asociado al transcurso de periodontitis experimental.

**Financiamiento:** FONDECYT de Iniciación N° 11180505, FONDECYT regular 1231728, FONDECYT regular 1231350.



## INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria multifactorial desencadenada por un microbioma disbiótico que se acumula en el área subgingival. Este fenómeno desencadena una respuesta inmune inflamatoria local desregulada, ocasionando la destrucción de las estructuras de soporte del diente, siendo una de las causas principales de la pérdida dentaria, con una consiguiente disminución en la calidad de vida de los pacientes. En este contexto, la respuesta inmune del hospedero juega un papel crucial en el desarrollo y progresión de la periodontitis, y las células Th17 se han identificado como un componente esencial.

Los linfocitos T helper 17 (Th17), principales productores de IL-17A, se encuentran aumentados en cantidad total de células y proporción durante periodontitis. Estas células, a través de su citoquina principal y otros mediadores, exacerban la inflamación crónica presente durante esta enfermedad, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias y estimulando la resorción ósea alveolar.

Numerosos estudios respaldan la información de que la amplificación de *IL17a* está asociada con alteraciones en las comunidades subgingivales. Estos datos indican una relación directa entre el aumento de *IL17a* y la carga bacteriana total, específicamente en contexto de periodontitis severa asociada con la Deficiencia de Adhesión Leucocitaria de tipo I (LAD-1). Sin embargo, en la actualidad, se desconoce la influencia e interrelación del eje Th17/IL-17 sobre el microbioma subgingival, especialmente en ausencia de enfermedades como es LAD-1.

Existe una falta de estudios que analicen la interrelación del eje Th17/IL-17 y el microbioma, por lo que el nuevo conocimiento aportará a la comprensión de la etiopatogenia de la patología. Este conocimiento no solo contribuirá a una mejor comprensión de las interacciones entre el sistema inmunológico y la microbiota en el contexto de periodontitis, sino que también puede influir en el diseño de enfoques terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad, mejorando su manejo clínico.

## **MARCO TEÓRICO**

### **Generalidades de la periodontitis**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de tipo multifactorial que se encuentra asociada con una biopelícula bacteriana disbiótica, que se acumula en el área subgingival. Se caracteriza por la pérdida de tejido conectivo y soporte óseo, manifestándose clínicamente como la pérdida de inserción clínica (Papapanou y cols., 2018).

Esta patología corresponde a un problema de salud pública por su alta prevalencia a nivel global, afectando al 11,64% de la población mundial (GBD Diseases and Injuries Collaborators., 2020). Se ha asociado a condiciones y enfermedades sistémicas tales como, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, diabetes mellitus tipo 2, artritis reumatoide, enfermedad renal crónica, obesidad y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Chapple., 2014). En Chile, se ha reportado que un gran porcentaje de la población presenta signos de destrucción periodontal (Carvajal, 2016; Morales y cols., 2021). Se determinó que la prevalencia de pérdida de inserción clínica en la población adulta chilena para grupos de entre 33-44 años y 65-74 años fue de 93,5% y 97,6%, respectivamente (Gamonal y cols., 2010). Estudios recientes han revelado una alta prevalencia de periodontitis en la población chilena. Específicamente, en el estudio realizado por Morales 2021, se destaca esta alta prevalencia al compararla con la clasificación actual de enfermedades y condiciones periodontales de la Academia de Periodontología Americana y la Federación Europea de Periodontología (AAP/EFP) contra la clasificación de los centros de control y prevención de enfermedades y la Academia de Periodontología Americana (CDC/AAP). En adolescentes, el 75,6% presentó periodontitis según la actual clasificación siendo la mayoría en estadios I y II. En adultos, la prevalencia alcanzó el 99%, clasificándose mayormente en el estadio IV. La forma más común de periodontitis fue estadio IV localizada grado B (38,9%). Estos hallazgos subrayan la magnitud

del problema de salud pública en la población chilena y su impacto (Morales y cols., 2021).

Por otra parte, el estudio de la condición periodontal adquiere importancia debido a los efectos que tiene en la vida de las personas. A medida que la periodontitis progresa, conduce a la pérdida dental, causando edentulismo y disfunción masticatoria, lo que perjudica la nutrición, la autoestima y la calidad de vida de las personas (Kassebaum y cols., 2014; Tonetti y cols., 2017).

La efectividad del tratamiento periodontal se convierte en un desafío, ya que, a pesar de la disponibilidad de tratamientos para la periodontitis y la provisión de atención adecuada y oportuna, persiste la progresión de pérdida de inserción clínica (Billings y cols., 2018). Este hecho destaca la importancia de comprender más a fondo la patogénesis de la periodontitis, explorando los diferentes mecanismos que contribuyen al progreso de la enfermedad. En consecuencia, se vuelve indispensable desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas más eficaces, lo que implica el desarrollo de nuevas vías de investigación.

### **El microbioma subgingival durante periodontitis.**

La etiología de la periodontitis es de carácter multifactorial, dependiendo en gran medida de la microbiota que habita el área subgingival (Hernández y cols., 2011). Estudios han evidenciado que estas comunidades bacterianas por sí solas no son capaces de explicar el progreso de la periodontitis, por lo que se ha descrito que es necesario tener un hospedero susceptible para desencadenar una respuesta inmune local desregulada que conlleva finalmente a una destrucción de los tejidos periodontales, es decir, pérdida de tejido conectivo y óseo (Kinane y cols., 2017; Diaz y cols., 2016).

Estudios históricos han demostrado que existen diferencias en la abundancia de especies en salud y enfermedad (Socransky y Haffajee, 2005). Sin embargo, es posible detectar especies bacterianas que se manifiestan tanto en salud como en

periodontitis, expresándose con distinta frecuencia y proporción (Abusleme y cols., 2021). En periodontitis es posible identificar un aumento en la representación de bacterias anaerobias, en su mayoría Gram negativo como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* que son conocidas por desencadenar respuestas inmunitarias innatas, inflamatorias y adaptativas (Silva y cols., 2015; Abusleme y cols., 2021). La presencia de estos patobiontes en la biopelícula estimulan una respuesta inmunoinflamatoria de los tejidos gingivales y periodontales dando como resultado un daño tisular (Hajishengallis, 2014). Por el contrario, las comunidades microbianas asociadas a salud están dominadas por bacterias Gram positivo tales como *Streptococcus* spp., *Rothia* spp. y *Actinomyces* spp. (Silva y cols., 2015; Griffen y cols., 2012; Abusleme y cols., 2013; Abusleme y cols., 2021).

La necesidad de una mejor comprensión de los cambios presentes en la microbiota subgingival, durante salud y periodontitis, impulsó la utilización de estrategias más especializadas como es la secuenciación de librerías de amplicones del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (16S ADNr) (Griffen y cols., 2012), pudiendo ser analizados en base a la definición de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs), generalmente clasificadas a nivel género y en ocasiones llegando a nivel de especie. Esta técnica ha posibilitado caracterizar los cambios presentes en el microbioma subgingival identificando especies bacterianas clásicamente asociadas con periodontitis y especies bacterianas nuevas no tradicionalmente asociadas con esta enfermedad (Diaz y cols., 2016). El uso de la secuenciación también ha permitido conocer con una mejor resolución la interrupción en el ensamblaje de la comunidad bacteriana, denominado “disbiosis”, postulando así que la periodontitis es causada por comunidades polimicrobianas disbióticas y no solo por especies específicas (Winter y Baumler., 2014; Griffen y cols., 2012; Abusleme y cols., 2013).

Existe evidencia que señala alteraciones en la composición y estructura del microbioma durante periodontitis, manifestando un aumento en su potencial

patogénico (Socransky y cols., 1998). Durante la progresión de periodontitis, las comunidades van presentando nuevos taxones que se van tornando dominantes lo va acompañado con el aumento de su biomasa bacteriana (Abusleme y cols., 2013). Este aumento de biomasa se atribuye al enriquecimiento de nutrientes disponibles, derivados del fluido crevicular gingival y producto de la exacerbación de la inflamación por el progreso de la enfermedad. Además, se evidencia una adaptación a las condiciones ambientales como es la disminución de la cantidad de oxígeno. Es así como varios estudios respaldan la idea de un aumento significativo de la biomasa bacteriana durante periodontitis, destacando la influencia crucial de la inflamación, siendo este un determinante clave para la alteración de la microbiota subgingival (ter Steeg y van der Hoeven, 1990; Abusleme y cols., 2013; Diaz y cols., 2016).

### **Disbiosis y respuesta inmune inflamatoria.**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria desencadenada por la disbiosis de comunidades polimicrobianas. El término “disbiosis” corresponde a un estado de desequilibrio de las comunidades microbianas que se manifiesta mediante cambios en su abundancia relativa, composición y funcionalidad. Este desequilibrio puede ser tanto causa como consecuencia de factores relacionados con el hospedero o el ambiente, lo que resulta en un cambio microbiano (Levy y cols., 2017; Tiffany y Baumler, 2019).

Varios estudios a lo largo de los años han demostrado que las bacterias desempeñan un rol crucial en el desarrollo de la periodontitis. No obstante, es fundamental la presencia de un hospedero susceptible cuya respuesta inmunológica, que normalmente actúa de forma protectora, pueda presentar una respuesta exacerbada, aumentando así la destrucción de los tejidos (Dutzan y cols., 2017). La interacción entre las comunidades microbianas subgingival y las respuestas inmune inflamatorias locales son la responsable de la pérdida ósea y de los tejidos periodontales (Diaz y cols., 2016). De acuerdo con estos antecedentes, comprender los mecanismos inmunopatológicos que llevan a la

desregulación de la respuesta inmune del hospedero durante periodontitis se vuelve esencial para dilucidar su relación con la expresión de mediadores característicos y su influencia en las comunidades bacterianas durante la enfermedad.

### **Células Th17: su relación con la pérdida ósea y microbioma subgingival.**

En las superficies de las mucosas, las células T *helper* 17 (Th17) desempeñan un papel crucial en la regulación de la inmunidad del hospedero. Estas células, pertenecientes al subtipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, destacan por ser productoras primarias de IL-17A, cuya expresión está regulada por factores de transcripción como STAT3 y el distintivo factor ROR $\gamma$ t (Harrington y cols., 2005). El gen *rorc* codifica este último, conocido como ROR $\gamma$ t, y es responsable de la inducción de las células Th17 (Castro y cols., 2017). Se ha documentado que el eje Th17/IL-17 tiene un rol en la mantención de la homeostasis y la integridad de la barrera contra bacterias y hongos. En particular, estudios respaldan su participación en la contención de *Candida* spp. en la cavidad oral (Conti y cols., 2009).

Las respuestas inmunológicas exacerbadas mediadas por células Th17 están asociadas a diferentes enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la psoriasis, diabetes tipo 1, artritis reumatoide y periodontitis, entre otras (Gaffen y cols., 2014; Dutzan y Abusleme., 2019). Estudios han evidenciado niveles elevados de IL-17 en periodontitis (Zenobia y Hajishengallis, 2015). Estos hallazgos están relacionados con un aumento de la severidad de parámetros clínicos destrucción periodontal. Se ha descrito que IL-17 amplifica la inflamación al reclutar neutrófilos, fomentando la producción de factores antimicrobianos, citoquinas proinflamatorias y activación de osteoclastos, contribuyendo así a la destrucción periodontal y pérdida de hueso alveolar (Moutsopoulos y cols., 2015; Abusleme y Moutsopoulos, 2017). Además, existe evidencia que respalda la idea que la inhibición de Th17 resulta en una reducción del 50% a 70% en la pérdida ósea, según modelos de periodontitis experimental (Dutzan y cols., 2018).

En investigaciones previas llevados a cabo en pacientes con Deficiencia de Adhesión Leucocitaria tipo I (LAD-1), que presentan manifestaciones orales de periodontitis severa, se evidenciaron cambios en la microbiota subgingival, vinculadas con la disbiosis de las comunidades. En este contexto, se observó que la inhibición de IL-17 tuvo un efecto significativo en la carga bacteriana total, generando una disminución notable de la misma (Moutsopoulos y cols., 2014). Asimismo, en estudios recientes de diabetes tipo 2 han demostrado un aumento de inflamación periodontal, pérdida de hueso alveolar y respuestas exageradas del eje Th17/IL-17 acompañados de disbiosis de las especies subgingivales (Xiao y cols., 2017). No obstante, aún se desconoce la influencia de este eje sobre la microbiota subgingival en ausencia de patologías sistémicas existiendo la necesidad de investigar esta interrogante.

### **Modelos de experimentación**

Para poder investigar sobre los cambios que existen en la transición desde salud a periodontitis, es necesario contar con un modelo experimental que permita analizar los distintos factores que influyen en dicha transición, de forma controlada. Actualmente existen modelos experimentales para la investigación de los cambios que existen de la transición desde salud periodontal hasta llegar al estado de enfermedad. Un modelo experimental reconocido es el de periodontitis inducida por ligadura (PIL) en ratones, el cual genera las condiciones similares a las que se aprecian en humanos y que permiten analizar los distintos factores asociados con la progresión desde salud a enfermedad. Este modelo consiste en la colocación de una ligadura en el segundo molar para inducir un acúmulo local de placa bacteriana, facilitando la inflamación gingival mediada por la microbiota subgingival disbiótica y finalmente induciendo pérdida ósea del hueso alveolar (Graves y cols., 2008; Abe y Hajishengallis, 2013). Por medio de este modelo, es posible el estudio simultáneo de la microbiota y la respuesta inmune del hospedero durante la inducción de periodontitis experimental, con el fin de entender con mayor claridad la patogénesis de la pérdida de hueso alveolar.

Se han llevado a cabo re-análisis bioinformáticos de estudios relacionados con este modelo experimental y la disbiosis asociada tal como lo evidencia el artículo de Arce y cols. (Arce y cols., 2022). Estos análisis han permitido obtener información sobre los cambios microbianos en el contexto de periodontitis experimental. Las variaciones experimentales y metodológicas entre los diversos artículos analizados pueden influir en las comunidades microbianas, manifestándose en cambios tanto en su estructura y composición, como en la abundancia relativa de los taxones. En particular, se identificó un cambio notable en la abundancia relativa a medida que se desarrolla la disbiosis.

En condiciones de salud, las comunidades microbianas han sido identificadas como *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*). Con respecto a las especies predominantes durante el modelo de periodontitis inducida por ligadura destaca *Enterococcus* spp. (*E. faecalis*) como la OTU más abundante junto con *Ligalactobacillus* sp. (*L. murinus*). Estos hallazgos refuerzan la idea de que la etiopatogenia de periodontitis no se atribuye solo a microorganismos específicos, pero que es necesaria su presencia. Además, se observa una marcada heterogeneidad en las comunidades subgingivales durante el establecimiento de la enfermedad.

A pesar de esto, existen pocos antecedentes respecto a la interrelación de respuestas inmunes específicas importantes para la destrucción ósea y los cambios en la microbiota durante el desarrollo de periodontitis. Por lo tanto, surge la necesidad de comprender el papel de las células Th17 y su relación con la microbiota subgingival durante el transcurso de periodontitis, ya que no se ha estudiado su influencia en la microbiota durante ese proceso. Debido a lo anterior, a través de este estudio se desea evaluar de forma conjunta estas variables para permitir obtener una visión integrada de lo que está ocurriendo durante la progresión de periodontitis.



## Planteamiento del problema

La periodontitis, es una enfermedad inflamatoria crónica que ha sido objeto de numerosos estudios. Se encuentra asociada a un microbioma disbiótico y a una respuesta inflamatoria local desregulada por parte del hospedero lo cual lleva finalmente a la destrucción de los tejidos de soporte del diente (Curtis y cols., 2020). Es en este contexto que ha sido objeto de estudio las interacciones entre el sistema inmunológico del hospedero y el microbioma subgingival. Investigaciones previas han resaltado el papel crucial del eje Th17/IL17 en la modulación de las comunidades bacterianas en el área subgingival, con evidencia de una relación directa entre la presencia de *IL17a* y la carga bacteriana total, particularmente en casos de periodontitis más severa (Moutsopoulos y cols., 2014)

A pesar de estos avances, persiste el desconocimiento respecto a la influencia del eje Th17/IL17 sobre el microbioma subgingival, incluyendo la abundancia relativa de las OTUs. Esta falta de comprensión limita la posibilidad de comprender los mecanismos subyacentes de la enfermedad sino también su estudio proporciona nuevo conocimiento que en un futuro pueda aportar al desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas al tratamiento de periodontitis.

Por lo tanto, la investigación propuesta, se centra en desentrañar la complejidad del eje Th17/IL17 y su impacto sobre el microbioma subgingival, incluyendo la variación en la abundancia relativa de las OTUs, en casos de periodontitis experimental.

## **HIPÓTESIS**

Considerando los antecedentes antes expuestos, proponemos la siguiente hipótesis:

“Existe una correlación positiva entre la expresión de genes asociados con las células Th17, la abundancia relativa de algunas unidades operacionales taxonómicas (OTUs) específicas y la carga bacteriana total del microbioma subgingival durante el transcurso de periodontitis experimental”.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la correlación entre la expresión de genes asociados con las células Th17, la abundancia relativa de algunas OTUS específicas y la carga bacteriana total del microbioma subgingival durante el transcurso de periodontitis experimental.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Determinar la abundancia relativa de OTUs y su taxonomía en muestras de microbioma subgingival durante periodontitis experimental.
- 2.- Determinar la covariación entre la expresión de genes *Rorc* e *Il17a* (asociados con las células Th17), la abundancia relativa de OTUs y la carga bacteriana total del microbioma subgingival durante el transcurso de periodontitis experimental.

## **METODOLOGÍA**

El desarrollo de esta tesis contó con el financiamiento y apoyo de los Proyectos FONDECYT de Iniciación N° 11180505, y FONDECYT regulares 1231728 y 1231350 (Ver Anexo 1, 2 Y 3).

### **Animales y modelo experimental de periodontitis inducida por ligadura**

Los procedimientos experimentales que se mencionan a continuación se realizaron con antelación a esta tesis, por lo cual los datos crudos de secuenciación masiva ya se encontraban a disposición para su análisis bioinformático.

Las muestras obtenidas del microbioma subgingival y tejido gingival de animales proceden de experimentos realizados previamente de ratones de la cepa C57BL/6. Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo bajo la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) (Anexo 4), de la Universidad de Chile. Los ratones C57BL/6 fueron obtenidos de la “Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile”, se emplearon 5 a 7 ratones por tiempo experimental (número total de animales, n=36), con 10 semanas de edad aproximadamente al momento de inducir la periodontitis experimental.

Se utilizó el modelo experimental de periodontitis inducida por ligadura (PIL), en el cual se coloca una sutura de seda 5-0 ligando alrededor del segundo molar superior, bajo anestesia, generando la acumulación de placa bacteriana e inflamación gingival alrededor del diente desencadenando así la pérdida ósea del hueso alveolar, la cual es medible a partir del quinto día (Abe y Hajishengallis, 2013). La recolección de muestras de tejido gingival y microbiano correspondió al día basal (para el tejido gingival, esta muestra corresponde al tejido sin ligadura y para el microbioma, esta muestra corresponde a una ligadura que permaneció en posición por 2 horas y después se recolectó) y luego a los días 1,3, 5 y 7 posterior a la instalación de la ligadura.

Para la cuantificación de carga bacteriana total, en los días experimentales mencionados anteriormente, se recolectó la sutura y se depositó en 150 µl de TE buffer y se almacenó a -80 °C, hasta su procesamiento posterior.

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

En síntesis, se empleó una versión modificada del protocolo de extracción del DNeasy Tissue and Blood Kit (Qiagen), para realizar el aislamiento del ADN, especificado por Abusleme y cols. 2017 (Abusleme y cols., 2017). Además, se llevó a cabo la secuenciación del gen 16S ADNr mediante la plataforma MiSeq (Illumina), descrito por Dutzan y cols. 2018 (Dutzan y cols., 2018), utilizando partidores que amplificaron la región V3 y V4 del gen 16S ADNr.

### **Extracción de ARN y RT-qPCR**

Las muestras de tejido gingival obtenidas fueron analizadas previamente para la expresión de los genes *Rorc* y *Il17a*. Brevemente, los tejidos fueron disgregados mecánicamente y se procedió a la extracción de ARN total de los tejidos gingivales utilizando 1 ml del reactivo "TRIzol™", conforme las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Finalmente, el RNA fue solubilizado en 20 µl de agua libre de ARNasa. La cantidad de ARN extraído se realizó con el Espectrofotómetro "NanoDrop™" (Thermo Scientific), evaluando la absorbancia a 260 nm y con el coeficiente 260/280, respectivamente. El RNA obtenido fue convertido a ADNc utilizando el kit High-Capacity DNAc Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), conforme a lo establecido por el fabricante. Posteriormente se procedió a analizar la expresión de los genes *Rorc*, *Il17a* y *hprt* (gen housekeeping utilizado como referencia), a través de qPCR utilizando ensayos TaqMan, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (que incluían los primers y sondas adecuados para dichos genes). El sistema de PCR en tiempo real utilizado fue el QuantStudio 3, de Applied Biosystems. Para calcular los niveles de expresión génica y la expresión diferencial de estos genes se utilizó el método  $2^{-\Delta CT}$  y  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **Cuantificación de Carga Bacteriana total**

La cuantificación mediante qPCR se llevó a cabo utilizando cebadores del gen 16S ARNr para su cuantificación (Moutsopoulos y cols., 2015). La estimación de la biomasa total se fundamentó en curvas estándar de ADN genómico diluido, abarcando un rango de  $10^2$  a  $10^8$  moléculas del gen 16S ARNr. La cuantificación se realizó en triplicado mediante el uso de TaqMan Gene Expression Master Mix, oligos y sondas TaqMan personalizadas, empleando el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus, siguiendo las recomendaciones del fabricante (LifeTechnologies).

Es importante mencionar que los datos de carga bacteriana total y expresión de los genes *Rorc* e *Il17a* se determinaron previamente en las tesis del Sr. Lukas Restelli y Srta. Romina Godoy, respectivamente.

### **Análisis bioinformático de las muestras microbiológicas secuenciadas**

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

Para el procesamiento bioinformático de los datos se utilizó el software mothur (<http://www.mothur.org>) (Schloss y cols., 2009). En primer lugar, las secuencias correspondientes a cada muestra fueron ensambladas en *contigs*. En el siguiente paso, se eliminaron los partidores, las secuencias espaciadoras y las secuencias índices que diferenciaban a cada muestra. Después se procedió a filtrar los *contigs* de acuerdo con su tamaño (incluyendo sólo secuencias que tengan desde 200 hasta 400 pares de bases, bp) y a la presencia de ambigüedades en las secuencias (no se admitirán asignaciones de bases ambiguas). Los pasos siguientes del pre-procesamiento, se utilizó el protocolo estándar establecido ([https://mothur.org/wiki/miseq\\_sop/](https://mothur.org/wiki/miseq_sop/)) (Kozich y cols., 2013), que es detallado a continuación. Para facilitar el análisis en términos de la capacidad computacional requerida, se utilizó el comando `unique.seqs`, para trabajar sólo con aquellas secuencias únicas lo que facilita la siguiente etapa de alineamiento. En el paso siguiente se procedió a alinear las secuencias utilizando como base los archivos

de referencia SILVA, que fue ajustado a la región de interés (región variable V4 del gen 16S ARNr). Posteriormente, se procedió a filtrar el alineamiento, a re-agrupar las secuencias permitiendo pocas diferencias entre ellas (usando el comando `pre.cluster`) y a eliminar las secuencias quiméricas, utilizando el algoritmo VSEARCH (Rognes y cols., 2016). Para la asignación de la identidad taxonómica, las secuencias fueron clasificadas utilizando la última versión implementada en `mothur` del Ribosomal Database Project (RDP) classifier (Wang y cols., 2007) con un *cutoff*=80.

b) Determinación de Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs)

A través del software `mothur`, se utilizó la función `get.oturep` para seleccionar la secuencia representativa de cada OTU. Posteriormente, a partir de este archivo, se extrajeron las secuencias de las OTUs necesarias, las cuales fueron sometidas a un análisis de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en la base de datos de NCBI. Durante el proceso, se restringió la búsqueda de 16S ARNr de bacterias y arqueas para obtener comparaciones precisas. El propósito de este procedimiento fue lograr la clasificación taxonómica mediante la agrupación de secuencias genéticas según su similitud, dando lugar a las Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) a nivel de especies. La especie aproximada se reportó entre paréntesis, estableciendo un umbral de similitud del 97% para la identificación de las OTUs. En ciertos casos, solo se logró identificar hasta el nivel de género, ya que las OTUs resultaron ser más heterogéneas en niveles taxonómicos superiores (Dutzan y cols., 2017; Abusleme y cols., 2017, 2020). Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo de la abundancia relativa de cada OTU utilizando el comando `get.relabund`, implementado en `mothur`.

c) Análisis de  $\alpha$ -diversidad,  $\beta$ -diversidad y abundancia relativa

Para evaluar la  **$\alpha$ -diversidad**, que cuantifica la diversidad total de la comunidad de una muestra (Ashton et al., 2016), se empleó el software `mothur`, específicamente a través del comando `sub.sample`. Posteriormente, se procedió al cálculo de los

parámetros de diversidad incluyendo los Índices no paramétricos de Shannon e Inverso de Simpson. Asimismo, se estimó la riqueza mediante la determinación del número de OTUs definidos.

Para llevar a cabo el análisis estadístico y la comparación entre las muestras, inicialmente se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos. En este caso, donde los datos presentaron una distribución normal, se seleccionó la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) junto con post test de Tukey. Este enfoque se empleó con el fin de identificar posibles diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Estas diferencias se consideraron significativas si el valor p obtenido fue menor a 0,05, indicando un nivel de significancia convencional. Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando el software Prism10 de GraphPad.

En el análisis de  **$\beta$ -diversidad**, que permite la comparación entre dos o más comunidades, evaluamos la composición y estructura de estas. Este proceso se llevó a cabo mediante una matriz de distancias basadas en Yue and Clayton Theta Similarity, la cual fue visualizada a través de un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Para la comparación y separación estadísticamente significativa de las muestras se empleó el análisis de varianza molecular (AMOVA) implementado en mothur.

Para determinar la abundancia relativa de las OTUs, empleamos el software mothur y su comando get.relabund. Posteriormente, aplicamos el método LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) para comparar estas abundancias (Segata y cols., 2011). Finalmente se llevó a cabo el análisis discriminante lineal (LDA) para estimar el tamaño de la abundancia que diferencia a cada taxón, donde se consideraron significativos los valores de LDA superiores a 2.5 (Regueira-Iglesias y cols., 2023). Todos los gráficos resultantes fueron generados mediante el software R (versión 4.2.2, <https://www.r-project.org>) y RStudio (<https://www.rstudio.com>).

d) Análisis estadístico de covariación y visualización de los datos

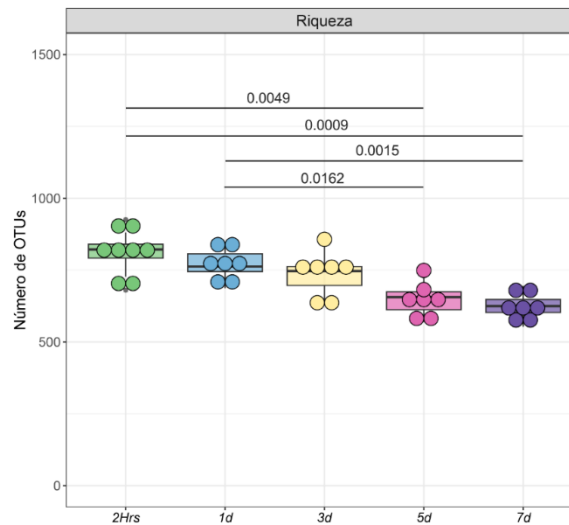
Para estos análisis de covariación, utilizamos el paquete “mixOmics” (Liquet y cols., 2012), ocupando el software R y la interfaz RStudio. En primera instancia se procedió a transformar los datos (abundancias relativas, carga bacteriana total y expresión de genes *Rorc* e *Il17a*) utilizando la “centered log-ratio transformation” (“CLR”). Después se procedió a utilizar el análisis de *sparse partial least squares* (“sPLS”), como esta implementado en mixOmics y ha sido previamente reportado para este tipo de datos (Schincaglia y cols., 2017). De estos análisis, se obtuvo un mapa de calor que muestra las correlaciones para las variables que resultaron ser significativas (todos estos gráficos son generados con el mismo paquete de R, en RStudio).



## RESULTADOS

### a) Alfa-diversidad de las comunidades del microbioma subgingival

En el análisis de la riqueza de las comunidades subgingivales (Figura 1) se examinó el número de OTUs a lo largo del desarrollo de periodontitis experimental. Se identificó una disminución estadísticamente significativa en el número de OTUs entre los grupos de las 2 horas y los días 5 y 7. Además, se observó una reducción estadísticamente significativo entre el día 1 y los días 5 y 7. Estos hallazgos indican una disminución de la diversidad de las comunidades a medida que progresa la disbiosis durante periodontitis experimental.



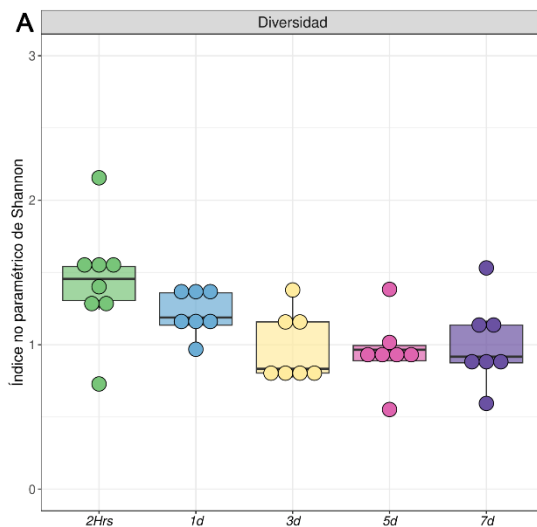
**Figura 1. Riqueza de las comunidades subgingivales durante periodontitis experimental.**

Box plot (cajas y clavijas), cada línea dentro de las cajas corresponde a la mediana, y cada círculo representa una muestra. Las líneas representan la significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

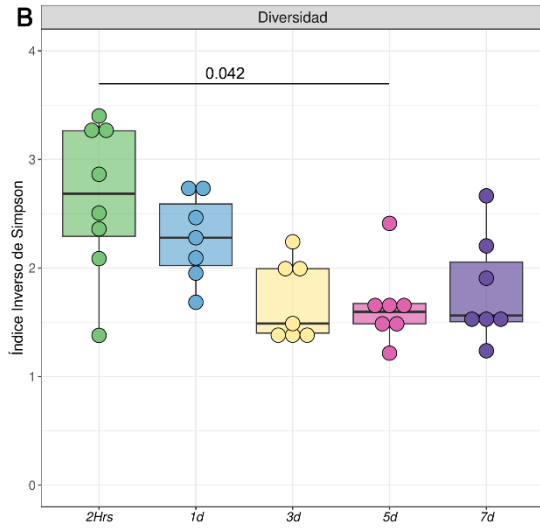
Se evaluó la diversidad de las especies bacterianas utilizando los índices de diversidad no paramétrico de Shannon (Figura 2A) e Inverso de Simpson (Figura 2B) en las comunidades microbianas a lo largo de la sucesión de días durante la inducción de periodontitis experimental. En la figura 2A, se observó una disminución gradual de las comunidades microbianas. La disminución se contrapone con la figura 2B, donde se observó una disminución estadísticamente

significativa en la diversidad de especies presentada, según se representó en el índice Inverso de Simpson, entre las 2 horas y el día 5.

Ambos índices revelaron una tendencia a la disminución de la diversidad de las comunidades a medida que se establece periodontitis experimental. En el día 3 se produce una estabilización de las comunidades en respuesta a la instauración de la disbiosis (Figura 2A y 2B).

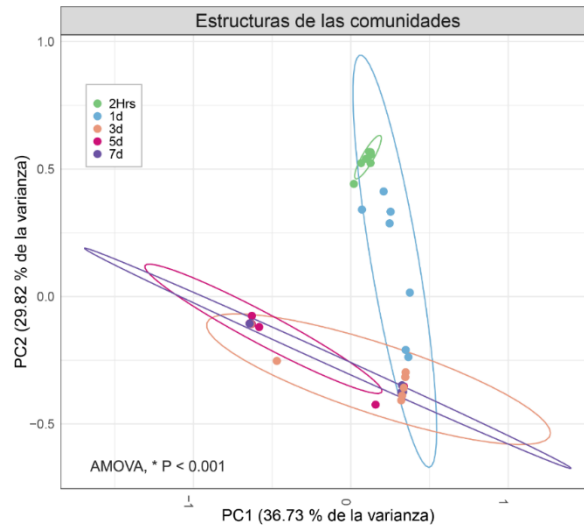


**Figura 2. Diversidad de comunidades subgingivales durante periodontitis experimental.** Box plot (cajas y clavijas), cada línea al interior de las cajas equivale a la mediana, los círculos a muestras (OTU). A). Índice de diversidad no paramétrico de Shannon. B). Índice de diversidad Inverso de Simpson.  $P < 0.5$ .



### **b) Estructura de comunidades del microbioma subgingival**

Al analizar la  $\beta$ -diversidad, evaluamos la estructura del microbioma subgingival mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA). Como se presenta en la figura 4, se puede observar dos agrupaciones distintas de estas muestras a lo largo de la sucesión de tiempo experimental. Las muestras de 2 horas y día 1, se tienden agrupar hacia el lado derecho, y a medida que se va avanzando la disbiosis de las comunidades, se aprecia un cambio en su estructura los días 3, 5 y 7 con las elipses convergiendo hacia el lado izquierdo. La proximidad de las muestras sugiere una mayor homogeneidad en la estructura de las comunidades microbianas, lo que puede indicar que comparten una composición de especies similar. Por lo contrario, cuando las muestras se dispersan, como se observa en el avance hacia el día 3, indica variabilidad en la composición del microbioma subgingival, y esto podría relacionarse con cambios en la abundancia relativa de especies entre las muestras. La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa (Tabla 1).



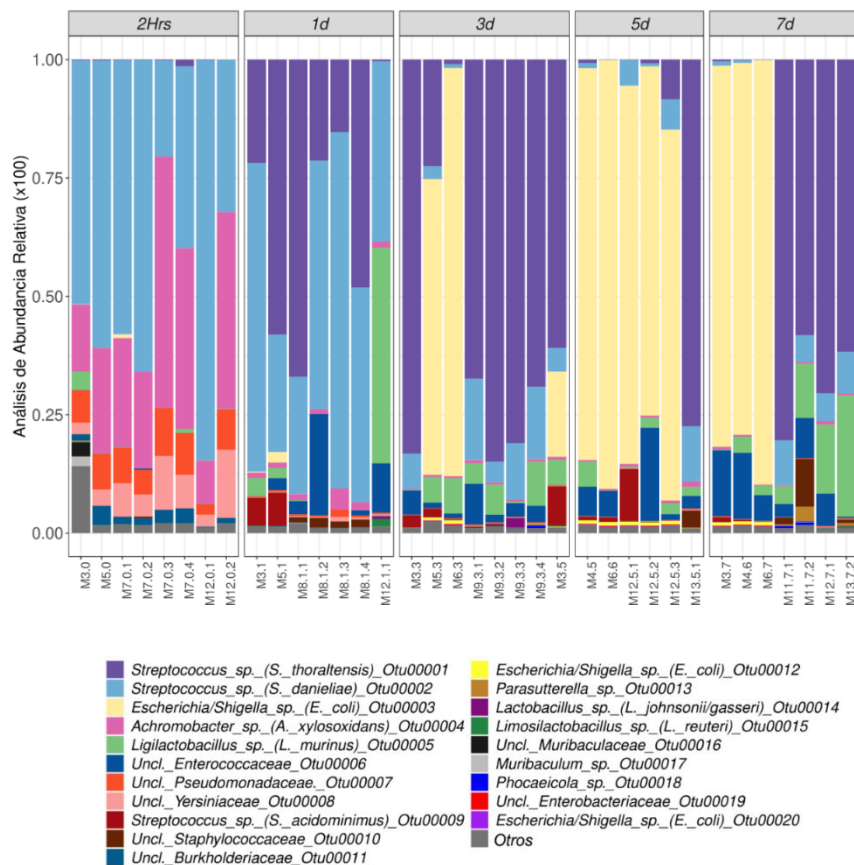
Días	2 hrs	1d	3d	5d	7d
2 hrs			<0.001*	0.001*	<0.001*
1d	<0.001*		0.001*	0.001*	
3d					
5d					
7d					

Tabla 1. Valores p significativos de la figura 4

**Figura 4. Cambios en la estructura microbiana durante periodontitis experimental.** Análisis de coordenadas principales (PCoA), cada esfera representa según una muestra, codificada por color en los distintos días agrupándose según la estructura de la comunidad microbiana. Estas agrupaciones de las muestras con elipse de confianza del 95%. Análisis estadístico realizado mediante análisis de varianza molecular (AMOVA).

### c) Abundancia relativa de especies bacterianas de las comunidades del microbioma subgingival

Primero, calculamos la abundancia relativa de las especies bacterianas más dominantes (figura 5), lo que proporcionó una representación visual de la distribución de microorganismos en las muestras analizadas, donde además se evidenció la diferencia entre los perfiles microbianos. Mediante el análisis de LEfSe (figura 6) identificamos si existían diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa de las OTUs encontradas. Este enfoque no sólo caracterizó qué especie se encuentran asociada con periodontitis inducida por ligadura, sino que también facilitó la visualización de los taxones que contribuyen de manera significativamente a estas diferencias.



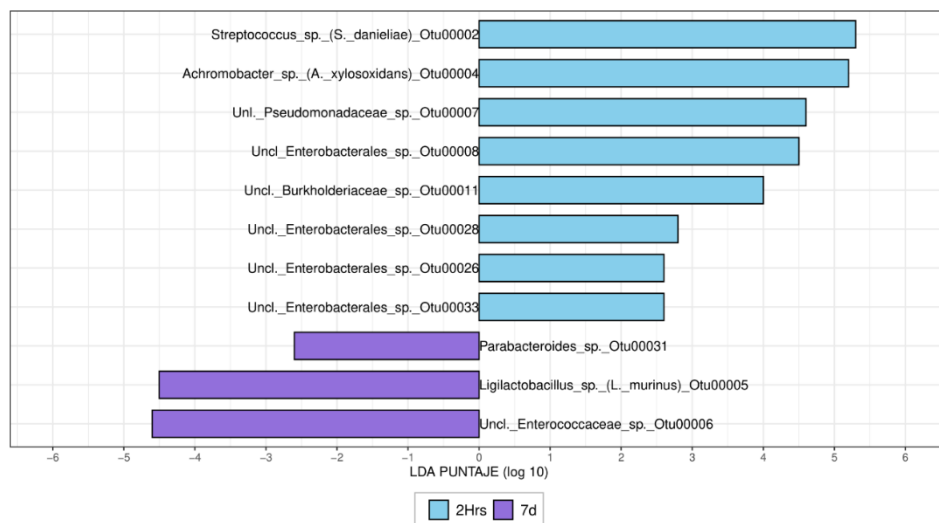
**Figura 5. Cambios en la composición microbiana durante periodontitis experimental.** Gráfico de barras apiladas. Cada barra en el gráfico corresponde a una muestra. El eje Y representa el porcentaje de abundancia relativa de cada especie respecto al total. La taxonomía a nivel de especies en aquellas OTUs que se clasificaron hasta nivel de género es indicada entre paréntesis, y presenta una similitud del 97% analizado por BLAST, usando la base de datos de nucleótidos de NCBI.

En la figura 5, se evidencia de patrones significativos en la composición del microbioma subgingival a lo largo del establecimiento de periodontitis. En las muestras de control, que corresponde a las 2 horas basales, se destaca una marcada predominancia de especies como *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*) en tono celeste y *Achromobacter* spp. (*A. xylosoxidans*) de color rosado. En el día 1, surge la presencia de *Streptococcus* sp. (*S. thoraltensis*) representados de color morado en un aumento notorio. Este hallazgo se respalda con la información de la figura 6, donde ambas especies bacterianas obtuvieron un puntaje LDA significativamente altos durante las 2 horas posteriores a la colocación de la ligadura.

A partir del día 3 hasta el 7, advertimos un cambio de la diversidad microbiana con la aparición de otras especies de mayor abundancia, como *Escherichia* spp. (*E. coli*) de color amarillo, y *Ligilactobacillus* spp. (*L. murinus*) de tono morado. Además, se registra un aumento significativo de *Streptococcus* sp. (*S. thoraltensis*). Estos resultados indican que, desde el inicio del primer día del establecimiento de periodontitis hasta los días sucesivos, se producen cambios sustanciales en la composición del microbioma subgingival.

Respecto a la figura 6 durante el día 7, se observó en particular una *Enterococcaceae* sp. la cual registró un LDA de -4.6, presentando una disminución significativa en su abundancia relativa en este periodo de tiempo.

**Figura 6. OTUs diferenciadas en los tiempos experimentales durante periodontitis experimental.** Se realizaron comparaciones entre las muestras de especies bacterianas con diferencia significativa en las abundancia relativa a las 2 horas y día 7 durante periodontitis experimental. Las barras apiladas representan las puntuaciones del análisis discriminante lineal (LDA), según el análisis de LEfSe.



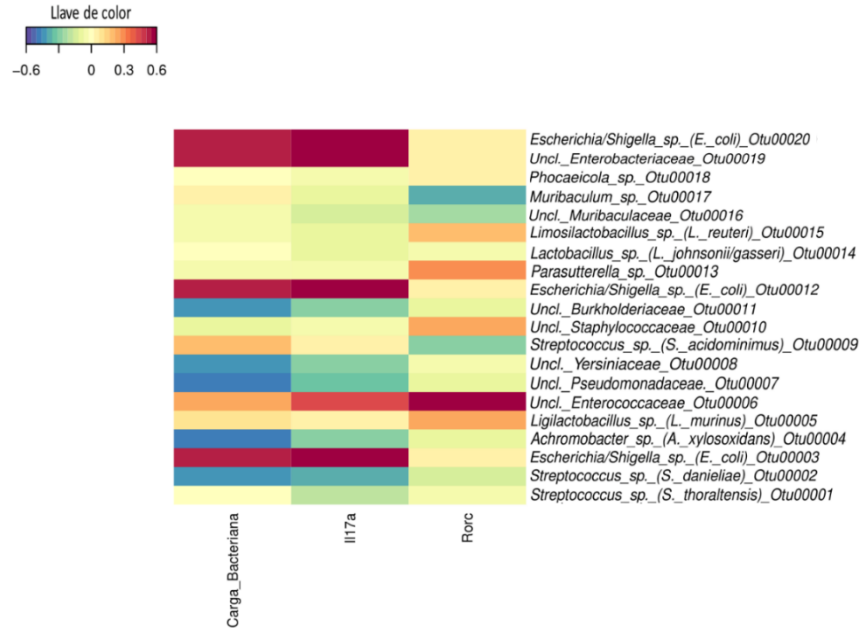


#### **d) Análisis de covariación de datos del microbioma y células Th17**

El objetivo de realizar el mapa de calor (figura 7), mediante el paquete mixOmics en el software R, fue investigar y representar las correlaciones existentes entre los datos del microbioma subgingival (OTUs), carga bacteriana total y la expresión de los genes *Rorc* e *Il17a* durante periodontitis experimental. Este gráfico fue una herramienta para visualizar e identificar patrones claros de correlación.

Las correlaciones son visiblemente destacadas según la aplicación de colores, azul, verde y rojo. Es importante destacar que estos colores representaron los coeficientes de correlación entre los datos. El azul denota una baja correlación, el verde sugiere una correlación moderada y el rojo indica una alta correlación positiva, y según la intensidad de los colores esto proporciona información respecto a las diferentes magnitudes en su correlación. Por lo que la paleta de colores proporcionó la oportunidad de una visualización de las relaciones y magnitudes de correlación entre los datos.

Específicamente, un conjunto de OTUs identificadas como *Escherichia* spp., muestra una correlación positiva significativa con carga bacteriana y los marcadores de células Th17 (*Il17a* y *Rorc*). Además, *Enterococcaceae* spp., presenta una correlación positiva con *Il17a* y *Rorc*, indicando una mayor expresión de este último. A diferencia de *Streptococcus danieliae* spp., que muestra una correlación inversa con carga bacteriana e *Il17a*. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión de las complejas interacciones en el microbioma subgingival en relación con la carga bacteriana y la expresión génica asociada con la inflamación periodontal.



**Figura 7. Covariación de datos del microbioma subgingival.** Mapa de calor (Heatmap). Este mapa presenta los resultados de correlación entre los datos del microbioma (OTUs), carga bacteriana total, expresión de genes *Rorc* e *II17a* mediante el paquete mixOmics utilizando software R. Las correlaciones se representan mediante rectángulos que varían de color desde azul hasta rojo, indicando una escala de menor a mayor correlación de los datos. En el lado superior derecho, el eje representa los datos del microbioma (OTUs), mientras que el eje inferior representa las variables de carga bacteriana, *II17a* y *Rorc*.

## DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se analizó la correlación entre la expresión de genes asociados a las células Th17, como lo es *Rorc* e *Il17a*, la abundancia relativa de las OTUs y la carga bacteriana total del microbioma subgingival durante el transcurso de periodontitis experimental.

Los objetivos planteados abordaron la determinación de abundancia relativa de OTUs, la covariación entre la expresión de genes *Rorc* e *Il17a* y la carga bacteriana total. Los resultados obtenidos ofrecen una perspectiva integral de las complejas interrelaciones entre el sistema inmune, la microbiota subgingival y la progresión de periodontitis experimental, destacando la relevancia de explorar estos aspectos para comprender la patogénesis de la enfermedad.

Los hallazgos de este estudio proporcionan evidencia que respalda la hipótesis inicial de una correlación positiva entre la expresión de genes asociados con células Th17 y la carga bacteriana en el microbioma subgingival durante periodontitis experimental. La disminución estadísticamente significativa en el número de OTUs entre las primeras 2 horas y los días 5 y 7, así como la reducción entre el día 1 y los días 5 y 7, sugieran una disminución en la diversidad microbiana a medida que progresa la periodontitis experimental. Esta tendencia se refuerza con la observación de una disminución significativa en la diversidad de especies, indicada por el Índice Inverso de Simpson. Estos hallazgos sugieren una dinámica compleja en la composición microbiana durante la instauración y evolución de periodontitis, destacando momentos clave de cambio y posiblemente indicando adaptaciones de las comunidades frente a condiciones inducidas.

En el análisis de estructuras de comunidades microbianas mediante PCoA revela cambios estadísticamente significativos en la composición del microbioma subgingival durante el establecimiento de periodontitis experimental. Se observó una agrupación diferenciada y estadísticamente significativa de las muestras en función de los tiempos experimentales, lo que indica una evolución de la estructura del microbioma. Este patrón podría reflejar la respuesta dinámica de la microbiota

subgingival ante el desarrollo de periodontitis, confirmando la significancia de la separación observada entre las muestras.

Respecto a la abundancia relativa de las especies bacterianas, estas mostraron cambios importantes con relación a su composición. Se destaca principalmente el aumento significativo de especies como *Escherichia* spp. (*E. coli*), *Ligilactobacillus* spp. (*L. murinus*) y *Streptococcus* sp. (*S. thoraltensis*) en los días 3, 5 y 7 posterior al retiro de la ligadura. Estos hallazgos sugieren una respuesta adaptativa de la microbiota subgingival frente a las condiciones inducidas por periodontitis experimental.

El análisis de covariación de datos del microbioma subgingival y células Th17 reveló la presencia de tres grandes taxones bacterianos con correlaciones significativas. Específicamente, *Escherichia* spp., mostró una correlación positiva significativa con carga bacteriana y la expresión de genes *Rorc* e *Il17a*. Por otro lado, *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*), presentó una correlación inversa significativa con el aumento de la carga bacteriana y la expresión de *Il17a*. Este hallazgo adquiere relevancia, ya que *Streptococcus danieliae* está asociado a la salud periodontal en ratones (Abusleme y cols., 2020; Arce y cols., 2022), lo cual confirma la complejidad de las interacciones entre la microbiota subgingival, carga bacteriana y la respuesta inmune mediada por células Th17.

Por lo tanto, los resultados respaldan la hipótesis de correlación positiva entre la expresión de genes de células Th17 y la carga bacteriana en el microbioma subgingival durante periodontitis experimental. Confirmando la interacción propuesta entre las células Th17 y la microbiota subgingival. Estos hallazgos, que discutiremos a continuación, contribuyen de manera significativa a la comprensión de la compleja dinámica presente entre el sistema inmune y el microbioma durante el desarrollo de periodontitis experimental.

Con respecto a la disminución significativa en los resultados de diversidad del microbioma subgingival, evaluados mediante los índices aplicados durante el

establecimiento de periodontitis en los días experimentales, este fenómeno también se manifestó mediante la reducción en el número de OTUs, lo que refleja la disminución gradual de la riqueza y lo que va indicando una pérdida en la variedad de especies y una mayor dominancia de ciertos taxones. Estos resultados se condicen con la literatura disponible en Arce y cols. (Arce y cols., 2022), quienes realizaron un reanálisis bioinformático de secuenciación del microbioma de estudios que utilizaron el modelo de periodontitis inducida por ligadura (PIL) (Abe y Hajishengallis, 2013), determinando si las comunidades bacterianas eran similares entre los diferentes estudios. Los resultados de diversidad y riqueza revelaron que a pesar del tipo de región hipervariable estudiada todos los estudios presentaban un cambio en la abundancia relativa de las especies bacterianas desde el quinto día posterior a la instalación de la ligadura, presentando una composición diferente entre salud y periodontitis experimental. En específico, en el estudio de Kitamoto y cols. (Kitamoto y cols., 2020) donde también se utilizó el mismo método, pero en tiempos experimentales diferentes (control, 3, 7, 14 días), donde se obtuvieron como resultados una disminución en la diversidad y riqueza de las comunidades bacterianas.

La alteración de la diversidad, conocida como disbiosis, es sumamente importante para la patogénesis de la enfermedad. Se encuentra asociada a un desequilibrio de la microbiota hacia la predominancia de especies patobiontes, lo que conlleva a respuesta inmune exacerbadas e inflamación, contribuyendo al daño de los tejidos conectivo y de soporte. La reducción en la diversidad microbiana sugiere una pérdida de la resistencia de la comunidad bacteriana normal, permitiendo el establecimiento de patobiontes orales que contribuyen a la destrucción de los tejidos.

Estos resultados se relacionan con la literatura existente sobre la interacción entre la diversidad microbiana y la salud periodontal. Este última se asocia a comunidades microbianas estables y diversas, las cuales experimentan cambios en su composición y estructura. Este proceso se ha asociado con estados de

disfunción inmunológica y mayor susceptibilidad a periodontitis, donde la acumulación y aumento de biomasa bacteriana facilita la colonización de patógenos bacterianos, lo que a su vez permite la transición hacia la enfermedad. Estos resultados respaldan los estudios que mencionan la importancia de la disbiosis de las comunidades (Abusleme y cols., 2021; Curtis y cols., 2020)

Por otro lado, el análisis de la estructura del microbioma subgingival proporciona datos relevantes sobre las dinámicas de las comunidades microbianas, en cuanto a su composición, estructura y biomasa, durante periodontitis experimental. La separación de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo, revelada por el análisis de coordenadas principales, indica cambios significativos en la composición y abundancia relativa de las especies bacterianas. Estos cambios podrían afectar en la respuesta del hospedero y la progresión de periodontitis experimental.

Las muestras, durante las primeras fases del establecimiento de periodontitis experimental a las 2 horas y día 1, tendieron agruparse en el lado derecho del PCoA, lo que sugiere homogeneidad en las estructuras de las comunidades. En la medida que progresa la disbiosis en los días 3, 5 y 7, se van agrupando hacia el lado izquierdo, lo que indica una mayor variabilidad en la composición del microbioma subgingival. Esta variabilidad puede estar relacionada con los cambios presentados en la abundancia relativa de las especies, factor que puede desencadenar respuestas inflamatorias locales influyendo en la capacidad del hospedero su regulación y contribuir a la progresión de la enfermedad.

En esa misma línea, los cambios en la composición del microbioma subgingival a lo largo del desarrollo de periodontitis experimental, revela patrones que pueden tener implicaciones en la patogénesis de la enfermedad. Al examinar las especies detectadas y al ser relacionadas con la literatura disponible sobre las bacterias asociadas con periodontitis, se puede tener información sobre su potencial contribución a la inflamación y pérdida ósea.

En las muestras de las 2 horas basales, se observó una predominancia marcada de *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*) y *Achromobacter* spp. (*A. xylosoxidans*). La presencia de *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*), la cual se encuentra significativamente más representada en esta investigación en las primeras fases, es coherente con estudios como Arce y cols. (Arce y cols., 2022) que sugieren puede desempeñar un papel clave en la colonización inicial del biopelícula bacteriana, donde se observaron como especies dominantes e incluso puede ser considerada una especie bacteriana central de las comunidades orales murinas, lo que se ha descrito constantemente en otras investigaciones durante periodontitis experimental (Abusleme y cols., 2020). Por otro lado, la identificación de *Achromobacter* spp. puede ser relevante, ya que está asociado algunas especies con infecciones oportunistas (Bonis y cols., 2022), pero hasta la fecha no se ha documentado la presencia de esta especie bacteriana en casos de periodontitis.

Respecto al día 1, se observa un aumento de *Streptococcus* sp. (*S. thoralensis*), la cual ha sido identificada en estudios previos como un componente común en salud y enfermedad periodontal, algunas especies de este género se asocian con la acumulación de placa e inflamación gingival. En investigaciones se ha encontrado presencia de estas especies en la biopelícula del área subgingival en humanos (Dhotre y cols., 2016).

Ya a partir del día 3 hasta el día 7 de periodontitis experimental, se registran los principales cambios sustanciales en la composición del microbioma, con la aparición de especies como *Escherichia* spp. (*E. coli*) y *Ligilactobacillus* spp. (*L. murinus*). Esta última especie bacteriana se encontró de forma significativa en los análisis de LDA en el séptimo día del estudio. La presencia de *Escherichia* spp, se ha asociado con respuestas inflamatorias y liberación de mediadores proinflamatorios, se ha identificado como colonizadoras relacionadas con periodontitis experimental (Estemalik y cols., 2017). En diversas investigaciones se ha determinado que puede estar asociado como patógeno en periodontitis, debido a sus múltiples factores asociados a su virulencia que favorecen su colonización y

formación de biopelículas, lo que puede indicar la participación como bacterias proinflamatorias (Sharma y cols., 2016; Hernández-Jaimes y cols., 2022). En cambio, *Ligilactobacillus* spp. (*L. murinus*), menos estudiado en el contexto de periodontitis, pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, vinculada a desequilibrios en la microbiota oral y se encuentra presente de todas las muestras de los diferentes estudios presentes en el reanálisis de Arce y cols. (Arce y cols., 2022). Además, se ha detectado en artículos que evalúan el microbioma asociado a la mucosa en ratones (Abusleme y cols., 2020; Dutzan y cols., 2017)

Durante los días 5 y 7, se presentó un aumento en la abundancia relativa de *Streptococcus* spp. (*S. thoralensis*). La presencia persistente de *Streptococcus* spp. podría ser relevante por su implicancia en la contribución de la inflamación.

La identificación y análisis de estas especies bacterianas presentes en el microbioma subgingival durante el establecimiento de periodontitis experimental proporcionan información sobre los posibles contribuyentes en la exacerbación de la inflamación y pérdida ósea.

Respecto a la correlación de datos del microbioma y células Th17, visualizadas como un mapa de calor, que grafica los coeficientes de correlación encontradas entre los datos del microbioma subgingival, carga bacteriana total y la expresión de genes asociados a células Th17 como lo son *Rorc* e *Il17a*. Este análisis reveló patrones que destacan la complejidad en las interacciones entre la microbiota y la respuesta del hospedero durante periodontitis experimental.

Los resultados de la investigación indicaron un coeficiente de correlación positiva significativa entre variables representadas por colores más cercanos al rojo, lo que sugiere que ambas variables tenderán a aumentar. Lo que se logró observar específicamente en el aumento de la abundancia relativa de un conjunto de OTUs identificadas como *Escherichia* spp. Estas especies se encuentran asociadas con pérdida ósea en el contexto proinflamatorio durante periodontitis, muestra una correlación positiva significativa con el aumento en la expresión de *Il17a* y con



carga bacteriana. Esta asociación es relevante dado que *Escherichia* spp. pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae* y se ha asociado con respuestas inflamatorias (Hernández-Jaimes y cols., 2022). Su correlación positiva con el aumento de *IL17a* respalda la idea que ciertas bacterias pueden modular la respuesta inmune del hospedero hacia un perfil proinflamatorio, caracterizado por la activación de células Th17.

Por otro lado, *Enterococcaceae* spp. muestra una correlación positiva con la expresión del gen *Rorc*, indicando una posible influencia en la regulación de las células th17. La familia *Enterococcaceae*, en estudios como los realizados por Růžičková y cols. (Růžičková y cols., 2020), ha sido implicada en la inflamación intestinal y ha asociado con desequilibrios en la microbiota en condiciones inflamatorias. La correlación positiva con la expresión de *Rorc* sugiere que estas bacterias pueden experimentar una alta expresión, lo que posiblemente desencadena una respuesta inmunitaria específica, contribuyendo a la inflamación local.

Este análisis de correlaciones destacó la relevancia de comprender que ciertas especies pueden modular la respuesta inmune del hospedero durante periodontitis. En este contexto, *Escherichia* spp y *Enterococaccecae* spp., emergen como posibles contribuyentes a la respuesta inflamatoria y a la activación de células Th17 en el entorno subgingival. Estos hallazgos son consistentes con la literatura existente; por ejemplo, un estudio de Dutzan y cols. (Dutzan y cols., 2018) sugiere que un microbioma disbiótico podría desempeñar un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune. En este sentido, se observó un aumento de células Th17, y la inhibición de estas células se correlaciona con una disminución de la inflamación y de la pérdida ósea. Esto podría estar contribuyendo, de este modo, a la progresión de enfermedades inflamatorias como la periodontitis.

Para contextualizar los hallazgos obtenidos en este estudio, es crucial reconocer ciertas limitaciones que podrían afectar a la interpretación de resultados y

proporcionar oportunidades para mejoras en las futuras investigaciones. Las correlaciones observadas no implican causalidad directa, y otros factores no considerados podrían influir en las relaciones encontradas. Se podría realizar análisis experimentales adicionales, como estudios de intervención, para confirmar las relaciones causales entre las variables identificadas.

La identificación de correlaciones entre la expresión de genes relacionados con células Th17, carga bacteriana y abundancia relativa de ciertas OTUs durante periodontitis experimental, ofrece conocimientos fundamentales que tiene implicancias en su relevancia clínica. Como, por ejemplo, comprender las correlaciones específicas entre la respuesta de células Th17 y la microbiota podría permitir otro tipo de terapias con enfoques terapéuticos que aborden las interacciones específicas identificadas. Además, al poder identificar las especies bacterianas asociadas con la respuesta de células Th17, podría sugerir nuevas estrategias para modular la respuesta inmune, lo que podría ser una vía para controlar la inflamación asociada con la periodontitis.

Estos resultados abren el camino a la comprensión de la etiopatogenia de periodontitis, abriendo las puertas a posibles nuevas estrategias terapéuticas y subrayan la importancia de considerar la interrelación dinámica entre la respuesta inmune del hospedero y el microbioma en la patogénesis de la enfermedad. La aplicación de estos hallazgos en el ámbito clínico podría transformar el manejo de la enfermedad y así mejorar la calidad de vida de los pacientes.

## CONCLUSIÓN

- Los resultados de la presente investigación revelaron una disminución significativa en la diversidad bacteriana durante periodontitis experimental. A su vez, se identificaron patrones distintivos en la estructura de las comunidades a lo largo del tiempo experimental, como también se destacaron patrones notables en la distribución de microorganismos presentando cambios significativos en la abundancia de especies asociadas con periodontitis inducida por ligadura.
- Destacaron en la composición microbioma subgingival las especies bacterianas como *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*) durante el inicio del establecimiento de periodontitis inducida por ligadura y *Ligilactobacillus* spp. (*L. murinus*) al término del estudio.
- Se identificó taxones relevantes, como *Escherichia* spp. y *Enterococcaceae* spp., y su asociación positiva con la respuesta de las células Th17, junto con la correlación inversa de *Streptococcus* spp. (*S. danieliae*), subraya la interrelación compleja entre el microbioma subgingival y la respuesta inmune en la patogénesis de periodontitis experimental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., y Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*, 394(1-2), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002>.
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., y cols. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>.
- Abusleme, L., y Moutsopoulos, N. M. (2017). IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Diseases*, 23(7), 854-865. <https://doi.org/10.1111/odi.12598>.
- Abusleme, L., Hong, B.-Y., Hoare, A., Konkel, J., Diaz, P., y Moutsopoulos, N. (2017). Oral Microbiome Characterization in Murine Models. *Bio-Protocol*, 7(24), 1–13, e2655. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2655>.
- Abusleme, L., O’Gorman, H., Dutzan, N., Greenwell-Wild, T., y Moutsopoulos, N. M. (2020). Establishment and stability of the murine oral microbiome. *Journal of Dental Research*, 99(6), 721–729. <https://doi.org/10.1177/0022034520915485>.
- Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B. Y., y Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontology 2000*, 86(1), 57–78. <https://doi.org/10.1111/prd.12362>.
- Arce, M., Endo, N., Dutzan, N., y Abusleme, L. (2022). A reappraisal of microbiome dysbiosis during experimental periodontitis. *Molecular oral microbiology*, 37(5), 180–195. <https://doi.org/10.1111/omi.12382>.

- Ashton, J. J., Beattie, R. M., Ennis, S., y Cleary, D. W. (2016). Analysis and interpretation of the human microbiome. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(7), 1713–1722. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000809>.
- Billings, M., Holtfreter, B., Papapanou, P. N., Mitnik, G. L., Kocher, T., y cols. (2018). Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S130–S148. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12944>.
- Bonis, B. M., y Hunter, R. C. (2022). JMM Profile: *Achromobacter xylosoxidans*: the cloak-and-dagger opportunist. *Journal of medical microbiology*, 71(5), 10.1099/jmm.0.001505. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001505>.
- Carvajal, P. (2016). Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9(2), 177–183. <https://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.001>.
- Castro, G., Liu, X., Ngo, K., De Leon-Tabaldo, A., Zhao, S., y cols. (2017). ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$  signature genes in human Th17 cells. *PloS one*, 12(8), e0181868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181868>.
- Chapple, I. L. (2014). Time to take periodontitis seriously. *BMJ (Clinical research ed.)*, 348, g2645. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2645>.
- Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N y cols. (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *The Journal of experimental medicine*, 206(2), 299-311. <https://doi.org/10.1084/jem.20081463>.
- Curtis, M. A., Diaz, P. I., y Van Dyke, T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000, 83(1), 14–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>.

- Dhotre, S., Suryawanshi, N., Nagoba, B., y Selkar, S. (2016). Rare and unusual isolates of viridans streptococci from the human oral cavity. *Indian journal of pathology & microbiology*, 59(1), 47–49. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.174817>.
- Diaz, P. I., Hoare, A. y Hong, B. Y. (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *Journal California Dental Association*, 44(7), 421-435. <https://doi.org/10.1080/19424396.2016.12221035>.
- Dutzan, N., Abusleme, L., Bridgeman, H., Greenwell-Wild, T., Zangerle-Murray, T., y cols. (2017). On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity*, 46(1), 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.010>.
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., y cols. (2018). A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science translational medicine*, 10(463), eaat0797. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0797>.
- Dutzan, N., y Abusleme, L. (2019). T Helper 17 Cells as Pathogenic Drivers of Periodontitis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1197, 107–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28524-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28524-1_9).
- Estemalik, J., Demko, C., Bissada, N. F., Joshi, N., Bodner, D., y cols. (2017). Simultaneous Detection of Oral Pathogens in Subgingival Plaque and Prostatic Fluid of Men With Periodontal and Prostatic Diseases. *Journal of periodontology*, 88(9), 823–829. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.160477>.
- Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V. y Cua, D. J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews. Immunology*, 14(9), 585-600. <https://doi.org/10.1038/nri3707>.

- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I y cols. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology*, 81(10), 1403–1410. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100148>.
- GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* (London, England), 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
- Godoy, R., Abusleme, L., Dutzan, N., Arce, M (2022). Expresión de genes asociados a linfocitos Th17 durante periodontitis experimental. Tesis (cirujano dentista) --Universidad de Chile, 2022.
- Graves, D. T., Fine, D., Teng, Y.-T. A., Van Dyke, T. E. y Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(2), 89-105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x>.
- Griffen, A. L., Beall, C. J., Campbell, J. H., Firestone, N. D., Kumar, P. S., y cols. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME journal*, 6(6), 1176–1185. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.191>.
- Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol* 29, 248-257. <https://doi.org/10.1111/omi.12065>.
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 25534621, 15(1), 30-44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>.

- Hajishengallis, G., y Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L y cols. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 1123-1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>.
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A y cols. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of dental research*, 90(10), 1164–1170. <https://doi.org/10.1177/0022034511401405>.
- Hernández-Jaimes, T., Monroy-Pérez, E., Garzón, J., Morales-Espinosa, R., Navarro-Ocaña, A., y cols. (2022). High Virulence and Multidrug Resistance of *Escherichia coli* Isolated in Periodontal Disease. *Microorganisms*, 11(1), 45. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010045>.
- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J., y cols. (2014). Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of dental research*, 93(7 Suppl), 20S–28S. <https://doi.org/10.1177/0022034514537828>.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G. y Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>.
- Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Jiao, Y., Gilliland, M. G., 3rd, Hayashi, A., y cols. (2020). The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis. *Cell*, 182(2), 447–462.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.048>.



- Kornman K. S. (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *Journal of periodontology*, 79(8 Suppl), 1560–1568. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. y Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., y Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 17(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>.
- Liquet, B., Lê Cao, K. A., Hocini, H., y Thiébaud, R. (2012). A novel approach for biomarker selection and the integration of repeated measures experiments from two assays. *BMC bioinformatics*, 13, 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-325>.
- Morales, A., Strauss, F. J., Hämmerle, C. H. F., Romandini, M., Cavalla, F., y cols. (2021). Performance of the 2017 AAP/EFP case definition compared with the CDC/AAP definition in population-based studies. *Journal of periodontology*, 93(7), 1003–1013. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0276>.
- Moutsopoulos, N. M., Konkel, J., Sarmadi, M., Eskin, M. A., Wild, T., y cols. (2014). Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Science translational medicine*, 6(229), 229ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007696>.
- Moutsopoulos, N. M., Chalmers, N. I., Barb, J. J., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Dutzan, N., y cols. (2015). Subgingival microbial communities in Leukocyte Adhesion Deficiency and their relationship with local

immunopathology. PLoS pathogens, 11(3), e1004698.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004698>.

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol., 89 Suppl 1, S162-S170.  
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>.

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., y Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. The Lancet, 366, Issue 9499, 1809-1820.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8).

Regueira-Iglesias, A., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T., y Tomás, I. (2023). Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. Molecular oral microbiology, 38(5), 347–399. <https://doi.org/10.1111/omi.12434>.

Restelli, L., Abusleme, L., Dutzan, N., Arce, M (2022). Cuantificación de la biomasa del microbioma subgingival durante el transcurso de periodontitis experimental. Tesis (cirujano dentista) --Universidad de Chile, 2022.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., y Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ, 4, e2584.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.

Růžičková, M., Vítězová, M., y Kushkevych, I. (2020). The Characterization of Enterococcus Genus: Resistance Mechanisms and Inflammatory Bowel Disease. Open medicine (Warsaw, Poland), 15, 211–224.  
<https://doi.org/10.1515/med-2020-0032>.

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., y cols. (2016). Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. Journal of applied microbiology, 121(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>.

- Schincaglia, G. P., Hong, B. Y., Rosania, A., Barasz, J., Thompson, A., y cols. (2017). Clinical, Immune, and Microbiome Traits of Gingivitis and Peri-implant Mucositis. *Journal of dental research*, 96(1), 47–55. <https://doi.org/10.1177/0022034516668847>.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., y cols. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75,7537-7541. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., y cols. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., y cols. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci* 23, 329-355. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., y Kent, R. L., Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>.
- Socransky, S. S., y Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000, 38, 135-187. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>.
- ter Steeg, P. F., y van der Hoeven, J. S. (1990). Growth stimulation of *Treponema denticola* by periodontal microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57, 63–70. <https://doi.org/10.1007/BF00403156>.
- Tiffany, C. R., y Bäumlér, A. J. (2019). Dysbiosis: from fiction to function. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 317(5), G602–G608. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00230.2019>.

- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., y Otomo-Corgel, J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 456–462. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. y Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73, 5261-5267. <https://doi:10.1128/AEM.00062-07>.
- Winter, S. E. & Baumler, A. J. (2014). Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut Microbes* 5, 71-73. <https://doi:10.4161/gmic.27129>.
- Xiao, E., Mattos, M., Vieira, G. H. A., Chen, S., Correa, J. D., y cols. (2017) Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell Host Microbe* 22, 120-128 e124. <https://doi:10.1016/j.chom.2017.06.014>.
- Zenobia, C., y Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol* 2000, 142-159. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>.

## ANEXOS Y APÉNDICES

El presente proyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT de iniciación 11180505 (Anexo 1).



N° 018/FONDECYT/518

Programa  
Fondecyt

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

Señora  
LORETO ABUSLEME RAMOS

Estimada señora ABUSLEME:

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

En esta convocatoria concursaron 1.233 proyectos y se financiaron 363 (29,4%). Su propuesta fue evaluada en el Consejo de CIENCIA y calificada con 4.300 puntos, ubicándose en el lugar N° 5 del Grupo de Estudio de MEDICINA G2-G3 - CS. CLÍNICAS Y CS. DE LA SALUD PÚBLICA. En este Grupo concursaron 54 proyectos, se evaluaron 45 y aprobaron 14 (25,9%). La calificación del último proyecto financiado en este Grupo fue de 4.030 puntos.

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

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

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

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

Saludan atentamente a usted,

EDGAR VOGEL GONZÁLEZ  
Presidente  
Consejo Superior de Ciencia

MARIO HAMUY WACKENHUT  
Presidente  
Consejo Superior de Desarrollo Tecnológico

El presente proyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT regulares  
1231728 (Anexo 2).



**CERTIFICADO ADJUDICACIÓN  
CONCURSO FONDECYT REGULAR**

7 de Marzo del 2023

Alejandra Vidales Carmona, Subdirectora, Subdirección de Proyectos de Investigación, de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, certifica que Doña LÓRETO ANDREA ABUSLEME RAMOS, ha adjudicado el proyecto N° 1231728 en el Concurso Nacional de Proyectos FONDECYT Regular 2023, titulado DEFINING THE ROLE OF STREPTOCOCCUS GORDONII AND STREPTOCOCCUS SANGUINIS IN PERIODONTITIS PATHOGENESIS.

El proyecto, patrocinado por el/la UNIVERSIDAD DE CHILE, contempla una duración de 4 años – desde 1 de Abril del 2023 hasta el 31 de Marzo del 2027 –, y un financiamiento de \$63.820.000, \$66.220.000, \$66.220.000 y \$66.220.000, para cada año de ejecución, respectivamente.

Se extiende el presente certificado al/la interesado/a, para los fines que estime conveniente.

Alejandra Vidales Carmona  
Subdirectora  
Subdirección de Proyectos de Investigación  
Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo



El presente proyecto se encuentra adscrito al proyecto FONDECYT regulares  
1231350 (Anexo 3).

**Agencia  
Nacional de  
Investigación  
y Desarrollo**  
Ministerio de Ciencia,  
Tecnología, Conocimiento  
e Innovación

**CERTIFICADO ADJUDICACIÓN  
CONCURSO FONDECYT REGULAR**

7 de Marzo del 2023

Alejandra Vidales Carmona, Subdirectora, Subdirección de Proyectos de Investigación, de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, certifica que Don NICOLAS RAUL DUTZAN MUÑOZ, ha adjudicado el proyecto N°1231350 en el Concurso Nacional de Proyectos FONDECYT Regular 2023, titulado UNRAVELING THE ROLE OF JAK1 AND JAK2 PATHWAY IN PERIODONTITIS: DRIVERS OF IMMUNOPATHOLOGY AND POSSIBLE THERAPEUTIC TARGETS.

El proyecto, patrocinado por el la UNIVERSIDAD DE CHILE, contempla una duración de 4 años – desde 1 de Abril del 2023 hasta el 31 de Marzo del 2027 –, y un financiamiento de \$63.540.000, \$66.300.000, \$66.300.000 y \$66.300.000, para cada año de ejecución, respectivamente.

Se extiende el presente certificado al/a la interesado/a, para los fines que estime conveniente.

Alejandra Vidales Carmona  
Subdirectora  
Subdirección de Proyectos de Investigación  
Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo



Documento de Aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) (Anexo 4).



Santiago, a 24 de enero de 2019

Certificado n°: **19228-ODO-UCH**


**CERTIFICADO**

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

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

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

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

  
 Ronald Vargas Casanova  
 Director  
 CICUA – VID  
 Universidad de Chile



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