

# Nuevo modelo de patogenia de la periodontitis crónica: de la enfermedad infecciosa a la disbiosis polimicrobiana

Tomás I\*, Camelo-Castillo A\*\*, Balsa-Castro C\*\*\*, Castellano A\*\*\*\*, Novoa L\*\*\*\*\*, Mira A\*\*\*\*\*

## RESUMEN

**Objetivo:** analizar el microbioma subgingival asociado a la periodontitis crónica mediante la pirosecuenciación del gen ARN ribosomal 16S. **Material y método:** el grupo de estudio estuvo formado por 50 pacientes, 20 con salud periodontal (G-Control) y 30 con periodontitis crónica generalizada (G-Perio). De todos los pacientes se obtuvieron muestras subgingivales mediante puntas de papel autoclavadas, el ADN de las cuales se analizó mediante pirosecuenciación de los productos de PCR del gen ARNr 16S. La diversidad bacteriana se determinó mediante las curvas de rarefacción, índices de diversidad y análisis de Coordenadas Principales. La asignación taxonómica de las secuencias obtenidas se efectuó con el "Ribosomal Database Project classifier".

**Resultados:** en el total de las muestras analizadas, se identificaron 94 géneros bacterianos y 202 especies bacterianas (de 41 géneros de interés). Las curvas de rarefacción e índices mostraron un mayor número de especies en las muestras del G-Perio. En el G-Perio se obtuvieron porcentajes de abundancia significativamente superiores para *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema*, *Filifactor*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Desulfobulbus*, *Hallella*, *Bulleidia*, *Phocaeicola* y *Mogibacterium*; y porcentajes significativamente inferiores para *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Actinomyces* y *Johnsonella*. Se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de abundancia de 30 especies bacterianas entre ambos grupos de estudio. Hubo 14 géneros y 25 especies bacterianas que mostraron correlaciones significativas con los parámetros clínicos que definen la condición periodontal (profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y/o sangrado al sondaje).

**Conclusiones:** la pirosecuenciación del gen ARNr 16S reveló una mayor diversidad y diferente estructura-composición de la microbiota subgingival en la periodontitis crónica. Los organismos periodontopatógenos, aunque en bajas proporciones, también se encontraron en individuos sanos, por lo que esta patología no se puede considerar como una enfermedad infecciosa en el sentido clásico del término. Se corroboró, por el contrario, que esta enfermedad está asociada a una disbiosis polimicrobiana, caracterizada no solo por una mayor implicación de patobiontes "establecidos", sino también por la coexistencia de otros patobiontes con papel desconocido, como *Filifactor alocis*.

**PALABRAS CLAVE:** ARN ribosomal 16 S, disbiosis, microbioma humano, periodontitis crónica, placa dental.

## ABSTRACT

**Aim:** to analyze the subgingival microbiota associated with chronic periodontitis by pyrosequencing of 16 S rRNA gene.

**Material and methods:** the study group consisted of 50 patients, 20 with periodontal health (Control) and 30 with generalized chronic periodontitis (Perio). Patients subgingival samples were obtained by autoclaved paper points, DNA from which was analyzed by pyrosequencing of PCR products of 16 S rRNA gene. Bacterial diversity was determined by rarefaction curves, diversity indexes and principal coordinates analysis. The taxonomic assignment of sequences obtained was performed with the "Ribosomal Database Project classifier".

**Results:** in the total samples analyzed, 94 bacterial genera and 202 bacterial species (from 41 genera of interest) were identified. Rarefaction curves and indexes showed a greater number of species in the samples of Perio group. In the Perio group were obtained significantly higher abundance percentages for *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema*, *Filifactor*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Desulfobulbus*, *Hallella*, *Bulleidia*, *Phocaeicola* and *Mogibacterium*; and significantly lower percentages for *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Actinomyces* and *Johnsonella*. Significant differences were detected in the percentage of 30 bacterial species abundance between both study groups. There were 14 genera and 25 bacterial species which showed significant correlations with clinical parameters associated with periodontal status (probing depth, clinical attachment loss and/or bleeding on probing).

**Conclusions:** pyrosequencing 16 S rRNA gene revealed greater diversity and different structure-composition of the subgingival microbiota in chronic periodontitis. Periodontopathic organisms were found at low proportions in healthy individuals, supporting that this pathology cannot be considered an infectious disease in classical terms. On the contrary, the disease is associated with polymicrobial dysbiosis, which is characterized not only by greater involvement of "established" pathobionts, but also by the coexistence of other pathobionts of unknown role, such as *Filifactor alocis*.

**KEYWORDS:** chronic periodontitis, dental plaque, dysbiosis, human microbiome, RNA ribosomal 16S.

\*Profesora Titular de Universidad. Acreditada al Cuerpo de Catedráticos desde 2014. Coordinadora de la Unidad Clínica de Pacientes con Necesidades Especiales y del Oral Sciences Research Group. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

\*\*Licenciada en Microbiología y Máster Oficial en Biomedicina. Miembro del Laboratorio para el Estudio del Microbioma Oral. Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Fundación FISABIO, Valencia.

\*\*\*Máster en Bioinformática y Bioestadística. Miembro del Oral Sciences Research Group. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

\*\*\*\*Licenciada en Odontología y Máster Oficial en Ciencias Odontológicas. Miembro del del Oral Sciences Research Group. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

\*\*\*\*Licenciada en Odontología, Máster Oficial en Ciencias Odontológicas y Máster en Periodoncia. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.

\*\*\*\*\*Investigador Titular. Director del Laboratorio para el Estudio del Microbioma Oral. Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Fundación FISABIO, Valencia.

**Correspondencia:** Inmaculada Tomás Carmona. Unidad de Pacientes con Necesidades Especiales. Oral Sciences Research Group. Facultad de Medicina y Odontología. C/ Entrerrios s/n. 15782 Santiago de Compostela.

**Correo electrónico:** inmaculada.tomas@usc.es

**INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades periodontales se caracterizan por una inflamación y destrucción de los tejidos de soporte del diente, produciéndose en ocasiones, halitosis y, en casos avanzados, la pérdida dentaria<sup>1</sup>, lo que conlleva a una peor calidad de vida<sup>2</sup>. Estas enfermedades representan una de las condiciones patológicas que más afectan al ser humano. En España, en la encuesta de Salud Oral 2010 se obtuvo que el 16-30 % de los mayores de 35 años padecían periodontitis crónica, alcanzando el grado de severa el 5-11 %<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta esta prevalencia, una población aproximada de 48 millones de habitantes y una tendencia demográfica al envejecimiento, la periodontitis crónica representa un problema socio-sanitario muy importante, que afecta a más de 5 millones de españoles.

◀◀ 132

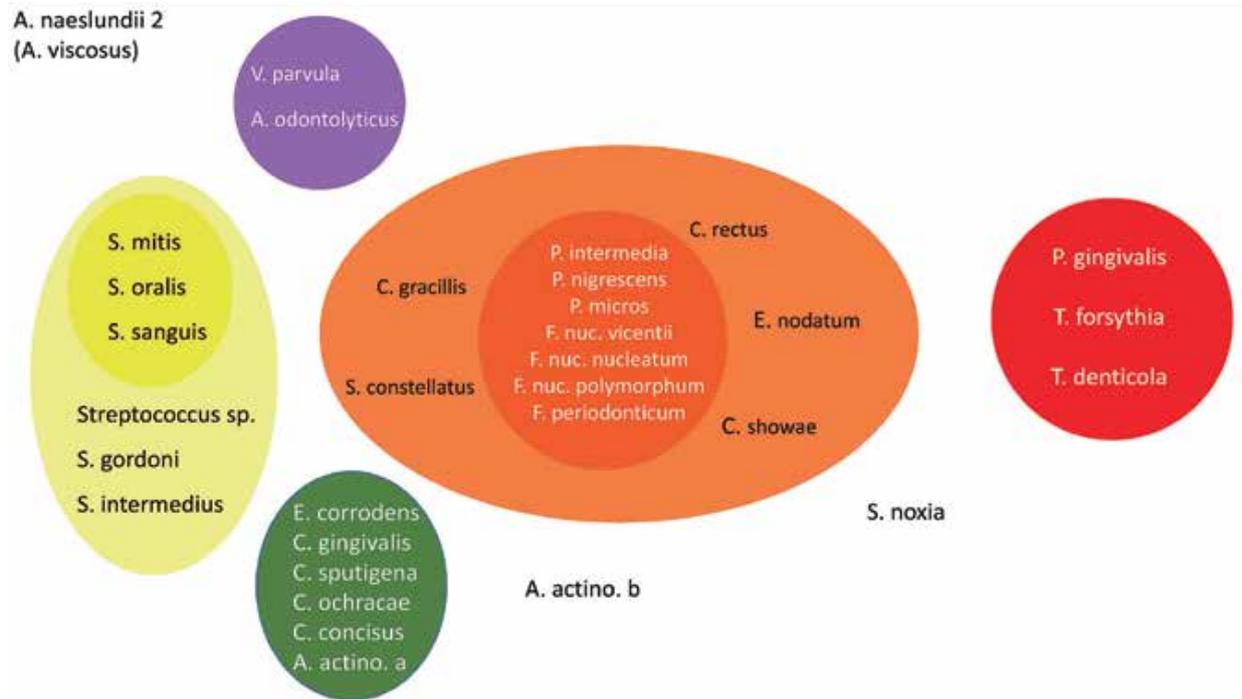


FIGURA 1. Complejos de Socransky asociados a la periodontitis crónica<sup>10</sup>.

Además de la constatada repercusión epidemiológica, una creciente evidencia científica ha demostrado que la periodontitis crónica representa un "factor de riesgo" de ciertas enfermedades y condiciones sistémicas, tales como enfermedades cardiovasculares<sup>4</sup>, diabetes mellitus<sup>5</sup>, infecciones respiratorias<sup>6</sup>, artritis reumatoide<sup>7</sup> e incluso enfermedad de Alzheimer<sup>8</sup>.

Las enfermedades periodontales son de origen multifactorial, su iniciación y progresión requieren de varios factores, particularmente la implicación de la microbiota subgingival<sup>9</sup>. Debido a esto, la microbiología periodontal ha sido motivo de una intensa investigación durante décadas. En 1998, Socransky et al.<sup>10</sup>, aplicando técnicas de hibridación genómica, identificaron tres especies que mostraban una fuerte asociación con la enfermedad periodontal: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (el denominado Complejo Rojo). A su vez, este Complejo estaba asociado a otras bacterias como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus constellatus* y *Fusobacterium periodonticum* (el denominado Complejo Naranja) (Figura 1)<sup>10</sup>.

El gen bacteriano ARN ribosomal 16S ha sido empleado en multitud de estudios de filogenia bacteriana y taxonomía, por contener regiones altamente conservadas y 9 regiones hipervariables (V1-V9) que permiten distinguir diferentes tipos bacterianos<sup>11</sup>. Actualmente, los métodos de secuenciación de última generación suponen una alternativa económica y de mayor rendimiento para identificar comunidades microbianas y efectuar comparativas genómicas que los métodos moleculares clásicos basados en la clonación<sup>12</sup>. En los años 2008-2012 se llevó a cabo la primera fase del proyecto multicéntrico denominado Proyecto Microbioma Humano (PMH), cuyo objetivo fue analizar el microbioma humano asociado a la salud en diferentes ecosistemas, incluyendo la cavidad oral. La gran cantidad de resultados genómicos derivados de la secuenciación masiva confirmó el concepto basado en "la colonización bacteriana masiva del ser humano", y estableció el comienzo de un nuevo paradigma en la investigación microbiológica<sup>13,14</sup>. A partir del PMH, el principal reto científico planteado se centró en estudiar el papel que la microbiota humana ejerce sobre la "salud" y la "enfermedad", así como las funciones que las bacterias endógenas desempeñan en todos los ecosistemas.

De forma paralela al PMH<sup>13,14</sup>, y en el campo de la microbiología oral, en los últimos años, la pirosecuenciación del gen ARN 16S ha sido una técnica muy usada para analizar el microbioma oral y caracterizar los cambios en la estructura y composición bacteriana asociada a la salud y a las enfermedades orales<sup>12</sup>. Esta nueva tecnología ofrece un gran número de lecturas de secuencias en una sola muestra, lo que permite detectar no solo los miembros más dominantes de la comunidad, sino también los taxones de baja abundancia<sup>15</sup>. La pirosecuenciación del gen ARN 16S de diversos ecosistemas y nichos orales

ha demostrado que existe una mayor diversidad microbiana con respecto a la detectada con tecnologías anteriores.

Hasta la fecha, algunos autores han comparado la microbiota subgingival de pacientes con enfermedad periodontal con la detectada en pacientes sanos usando la pirosecuenciación del gen ARN 16S<sup>16-21</sup>, pero la mayoría de estos han usado tamaños muestrales reducidos<sup>17-20</sup>. Es necesario, por tanto, estudiar más profundamente los cambios globales en la microbiota subgingival a medida que se produce el avance clínico de la enfermedad. Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar la estructura y composición de la microbiota subgingival asociada a la periodontitis crónica mediante la pirosecuenciación del gen ARN 16S, así como analizar su relación con los parámetros clínicos que definen la progresión de la enfermedad.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Selección de los grupos de estudio

Se seleccionaron 50 sujetos de los cuales, 20 fueron sujetos periodontalmente sanos (G-Control) y 30 fueron pacientes con periodontitis crónica generalizada moderada-severa (G-Perio). Los sujetos de ambos grupos cumplieron los siguientes criterios de inclusión: a) Edad entre 30 y 65 años, b) Buen estado de salud general ni embarazo ni lactancia, c) No ingesta de antimicrobianos durante los 6 meses previos, d) No ingesta de antiinflamatorios en los 4 meses previos, e) No usar rutinariamente ningún antiséptico bucal, f) No presentar implantes ni aparatos de ortodoncia, g) No haberse efectuado ningún tratamiento periodontal previo, h) Presencia de, al menos, 18 dientes, g) No fumar (durante un período superior a 5 años). Un odontólogo previamente calibrado efectuó el diagnóstico periodontal. La profundidad de bolsa y el nivel de inserción se registraron en toda la boca, en 6 sitios por diente usando una sonda PCP-UNC 15. El sangrado al sondaje y el nivel de placa bacteriana se evaluaron en toda la boca en 6 sitios por diente mediante la aplicación de una escala binaria (presencia/ausencia). Se realizó un estudio radiográfico consistente en una serie periapical de todos los dientes de la cavidad oral con el objetivo de valorar tanto la pérdida ósea existente como la integridad de las corticales óseas.

Los pacientes fueron diagnosticados de periodontitis crónica generalizada moderada-severa, basándose en criterios clínicos previamente establecidos<sup>22,23</sup> (Figura 2). El grupo control incluyó pacientes periodontalmente sanos sin profundidad de sondaje mayor a 4 mm, sin evidencia radiológica de pérdida ósea y sangrado al sondaje menor del 20 %.

Los pacientes fueron explorados y diagnosticados en las Unidades de Periodoncia y Pacientes con Necesidades Especiales de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio recibieron información verbal y por escrito sobre las características del estudio y firmaron el consentimiento informado. El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia (número de registro 2015/006).



◀◀ 134

FIGURA 2. Pacientes con periodontitis crónica generalizada moderada-severa que participaron en el estudio.

**Recogida de las muestras subgingivales**

Las muestras de placa subgingival fueron recogidas por la tarde, aproximadamente 5-7 horas después del cepillado. Las muestras se obtuvieron de cada sujeto insertando un total de 16 puntas de papel estériles (tamaño 30, 2 puntas de papel por localización) en el surco gingival o bolsa periodontal, durante 10 segundos, tras el aislamiento y la eliminación de la placa supragingival.

Las muestras subgingivales de los pacientes periodontalmente sanos se recogieron mediante el "barrido" de las puntas de papel en cada surco gingival de un total de 8 dientes de los cuadrantes 1 y 3 (incisivo, canino, premolar y molar)<sup>24</sup>. En los

pacientes periodontales, las muestras subgingivales se recogieron de las bolsas periodontales más profundas de cada cuadrante (un total de 8 localizaciones no adyacentes).

Las muestras fueron depositadas en tubos de microcentrifugado de 1,5 ml con 300 µl de una solución tampón fosfato y congeladas a -80 °C hasta su posterior análisis.

**Procesamiento de las muestras subgingivales**

- **Extracción del ADN.** El ADN fue extraído de cada muestra usando el kit de purificación de ARN y ADN *MasterPure™* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, Estados Unidos)

Queremos  
verte  
Sonreír

nuevo  
**Bexident**<sup>®</sup>  
**ANTICARIES**

**TRIPLE ACCIÓN ANTICARIES**

Su tecnología Cranperals Tech<sup>®</sup>, una innovadora combinación de fluoruro sódico y extracto de arándano rojo, aporta una triple acción anticaries y evita la colonización de las bacterias, incluso en las zonas de más difícil acceso.



Colutorio 500ml CN 178073,7  
Pasta dentífrica 125ml CN 178074,4

**ISDIN**

siguiendo las instrucciones del fabricante, con la adición de un tratamiento de lisozima<sup>25</sup>.

**- Amplificación con PCR y pirosecuenciación.** La amplificación del gen ARNr 16S se llevó a cabo con una polimerasa de ADN recombinante ultrapura termoestable *ABGene*<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Epsom, Surrey, Reino Unido) mediante los cebadores universales 8F y 533R, utilizando una temperatura de hibridación de 52 °C y 30 ciclos de amplificación<sup>24</sup>. Se realizaron 2 PCR por muestra, mezclando los productos de la PCR antes de la purificación. En 33 muestras subgingivales, no se pudo obtener suficiente producto de PCR y se realizó una PCR anidada, en la que el producto inicial de PCR se purificó y se usó como molde para una PCR secundaria en la que los cebadores se desplazaron 3 pares de bases (bp) hacia el extremo 3', modificándose para contener los adaptadores de pirosecuenciación A y B<sup>26</sup>.

Los 500 pb de los productos de la PCR fueron purificados con el kit de purificación *Nucleofast PCR* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y, además, limpiados de posibles contaminantes con el kit de beads magnéticos *AMPure<sup>®</sup> XP* (Roche, Roche, Basel, Suiza) antes de la pirosecuenciación. El ADN final por muestra se midió por fluorescencia *PicoGreen* en un fluorímetro *Modulus 9200* (Turner Biosystems, San Francisco, Estados Unidos) para que las muestras puedan ser posteriormente mezcladas en cantidades equimolares. Los productos de PCR fueron pirosecuenciados desde el extremo cebador directo mediante el uso de un secuenciador GS-FLX con la química de titanio-plus (Roche, Basel, Suiza) en el Centro de Investigación en Salud Pública de Valencia, España (FISABIO). Se utilizó un octavo de placa para cada grupo de 25 muestras, que fueron amplificadas con un cebador directo diferente que contenía un "código de barras" de 8 pb único. El "código de barras" del cebador permite múltiples amplificaciones de diferentes muestras que están mezcladas en una misma reacción de pirosecuenciación.

#### **Análisis bioinformático de los datos secuenciados**

Las secuencias fueron separadas usando los "códigos de barras" para distinguir las muestras a las que pertenecían. Las lecturas con un valor promedio de calidad inferior a 20 fueron excluidas. Asimismo, los extremos finales de las secuencias fueron recortados en ventanas de 10 pb si tenían un valor promedio de calidad inferior a 20, usando el software *Galaxy*<sup>27</sup>. Solo las lecturas mayores de 250 pb fueron consideradas. Las secuencias quiméricas fueron detectadas usando el software *Mothur v1.21.0*<sup>28</sup> y el 5 % de las lecturas se filtraron como quimeras potenciales.

Las curvas de rarefacción se calcularon al 97 % de similitud de secuencia usando el programa *CD-HIT*<sup>29</sup> para determinar las Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) a nivel de especie<sup>30</sup> y obteniendo las curvas usando el software *Analytic Rarefaction 1.3*.<sup>31</sup> Se calcularon los índices de diversidad bacteriana de Chao y Shannon (a nivel de especie) con el protocolo del "Ribosomal Database Project" (RDP)<sup>32</sup>,

normalizando las muestras al mismo número de secuencias mediante un muestreo aleatorio. Se efectuó un análisis de Coordenadas Principales (AcoP) mediante el programa *Fast UniFrac* usando el algoritmo ponderado<sup>33,34</sup>.

Las secuencias fueron taxonómicamente asignadas usando el clasificador RDP<sup>32</sup>. Cada lectura fue asignada hasta el nivel de género usando un umbral de confianza del 80 %. Para aquellos géneros que tuvieron diferencias significativas en la presencia/relativa abundancia entre individuos sanos y enfermos, se procedió a asignar las lecturas a nivel taxonómico de especie. Para ello, se construyó una base de datos propia con las secuencias de longitud completa de todas las especies pertenecientes a los géneros seleccionados que estaban presentes en el RDP. A continuación, utilizando *BlastN*<sup>35</sup> se efectuó una comparación de aquellas secuencias que se habían asignado previamente a los géneros seleccionados contra la base de datos propia. La especie de mayor similitud proporcionada por el programa para cada secuencia comparada se consideró como válida si la longitud de alineamiento era >350 pb, y la identidad de secuencia >97 %. Posteriormente, las especies fueron agrupadas según los Complejos clásicos de Socransky<sup>10</sup>.

#### **Análisis bioestadístico**

Para la comparativa de las variables cuantitativas relacionadas con los parámetros clínicos entre ambos grupos de estudio, se utilizó el test de Student para muestras independientes. Se aplicó el test exacto de Fisher para analizar la variable "género" entre ambos grupos de estudio.

La comparativa de las abundancias relativas de géneros, especies y complejos de Socransky entre los dos grupos de estudio se efectuó usando el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Las correlaciones entre la abundancia relativa de los géneros, especies y Complejos de Socransky con los valores de los parámetros clínicos (profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica y sangrado al sondaje de las localizaciones muestreadas) se evaluaron mediante el Coeficiente de Correlación de Spearman. El grado de significación considerado fue  $p < 0,05$ . Para el control de la tasa de falsos positivos en las comparaciones múltiples, se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg, asumiendo una tasa (valor Q) de 0,20 (en los géneros bacterianos), de 0,25 (en las especies bacterianas) y de 0,05 (en los Complejos de Socransky)<sup>36</sup>. Los resultados fueron analizados usando el *PASW<sup>®</sup> Statistics Base 20 package for Windows* (IBM, Madrid, España).

#### **RESULTADOS**

En la *Tabla 1* se detallan los datos sobre edad, género y características clínicas relacionadas con el estado de salud periodontal de los dos grupos de estudio. Las variables clínicas (índice de placa, sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica) presentaron valores significativamente superiores en el G-Perio que en el G-Control, tanto a nivel de boca completa como en las localizaciones seleccionadas para la toma de muestras subgingivales.

**TABLA 1**  
**EDAD, GÉNERO Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO, G-CONTROL Y G-PERIO**

PARÁMETROS CLÍNICOS	GRUPOS DE ESTUDIO		
	G-CONTROL (N= 20)	G-PERIO (N= 30)	Valor P
Edad	44,95 (13,04)	54,14 (11,90)	0,012
<b>GÉNERO</b>			
Hombres	7	9	NS
Mujeres	13	21	
Dientes (número)	26,36 (3,51)	25,61 (4,67)	NS
<b>BOCA COMPLETA</b>			
Índice de placa (%)	22,43 (14,33)	53,29 (27,44)	<0,001
Sangrado al sondaje (%)	13,86 (6,70)	57,98 (20,80)	<0,001
Profundidad de sondaje (mm)	2,08 (0,30)	3,35 (0,64)	<0,001
Nivel de inserción clínica (mm)	2,25 (0,37)	3,98 (1,12)	<0,001
<b>LOCALIZACIONES MUESTREADAS</b>			
Sangrado al sondaje (%)	7,98 (12,64)	71,45 (25,59)	<0,001
Profundidad de sondaje (mm)	2,35 (0,33)	5,84 (0,87)	<0,001
Nivel de inserción clínica (mm)	2,42 (0,36)	6,03 (1,02)	<0,001

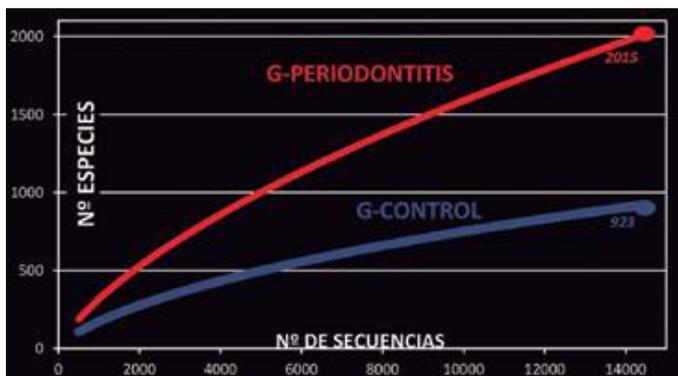


FIGURA 3A.

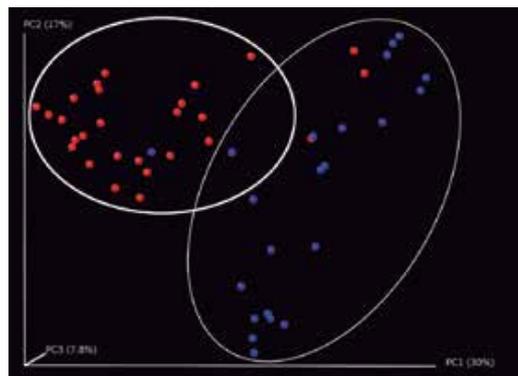


FIGURA 3B.

En la figura 3A se muestra la relación entre el esfuerzo de secuenciación (número de secuencias obtenidas) y el número estimado de especies bacterianas para los individuos del G-Control y aquellos del G-Perio. Estas curvas de rarefacción se realizaron agrupando las secuencias con una similitud superior al 97 % como pertenecientes a la misma Unidad Taxonómica Operativa (UTO), al ser éste el umbral establecido para bacterias de la misma especie. En la figura 3B se muestra un análisis multivariante en el cual los individuos analizados se acercan o se alejan entre sí en un espacio multidimensional dependiendo del grado de similitud en la estructura de su comunidad bacteriana.

### Diversidad y estructura de la microbiota subgingival: salud vs. periodontitis

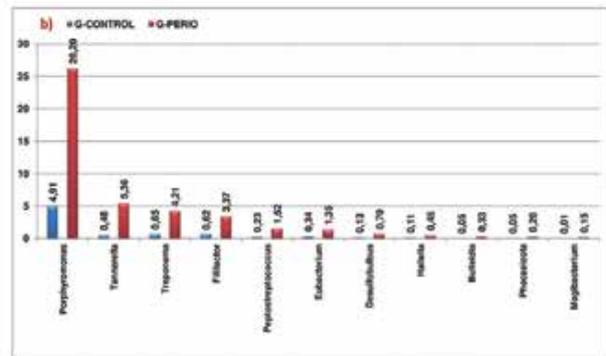
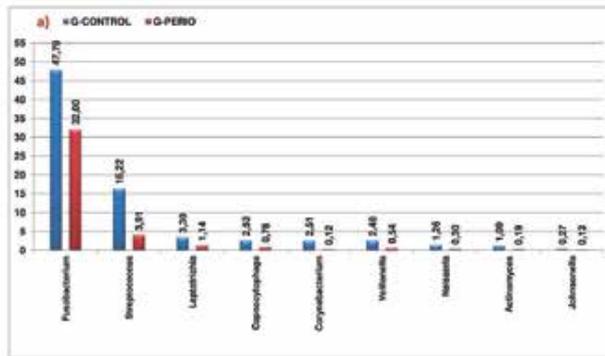
La media  $\pm$  desviación estándar de secuencias por muestra fue:  $2.541 \pm 4.235$  (para el G-Control) y  $1.932 \pm 2.516$  (para el G-Perio). El porcentaje de secuencias no clasificadas fue del 5,53 %.

Las curvas de rarefacción (Figura 3A) mostraron un mayor número de especies bacterianas en el G-Perio, donde aparecieron especies no detectadas en el G-Control (en torno a 2.015 especies en los pacientes con periodontitis frente a 923 especies encontradas en los pacientes con salud periodontal). Para obtener la riqueza bacteriana se calculó el índice de Chao, mostrando unos valores de 1.925 y 4.892 para G-Control

y G-Perio, respectivamente. Para evaluar la diversidad bacteriana se calculó el índice de Shannon, obteniéndose un valor de 4,04 para el G-Control y 5,32 para el G-Perio, respectivamente.

### Composición taxonómica de la microbiota subgingival: salud vs. periodontitis

En el total de las muestras analizadas, se identificaron 94 géneros bacterianos y 202 especies bacterianas (de 41 géneros de interés). Se detectó una elevada variabilidad inter-individual en la abundancia relativa a nivel de género y especie, tanto en el G-Control como en el G-Perio.



FIGURAS 4A Y 4B. Géneros bacterianos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa entre el G-Control y el G-Perio (a y b;  $p < 0,05$ ;  $Q = 0,20$ ).

TABLA 2 MEDIA DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE ESPECIES (VALORES SUPERIORES EN G-CONTROL)		
NOMBRE DE LA ESPECIE	G-CONTROL (%)	G-PERIO (%)
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0,42	0,11
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0,57	0,11
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0,52	0,16
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	33,63	19,53
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2,40	0,12
<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	0,61	0,11
<i>Leptotrichia hongkongensis</i>	0,95	0,13
<i>Neisseria elongata</i>	1,32	0,20
<i>Porphyromonas catoniae</i>	1,94	0,75
<i>Streptococcus cristatus</i>	2,13	0,72
<i>Streptococcus intermedius</i>	0,78	0,21
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	6,03	0,93
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3,18	0,63
<i>Veillonella denticariosi</i>	0,51	0,21
<i>Veillonella parvula</i>	1,64	0,41

TABLA 3 MEDIA DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE ESPECIES (VALORES SUPERIORES EN G-PERIO)		
NOMBRE DE LA ESPECIE	G-CONTROL (%)	G-PERIO (%)
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	0,12	0,92
<i>Eubacterium infirmum</i>	0,04	0,27
<i>Filifactor alocis</i>	0,64	2,52
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	0,23	0,98
<i>Phocaeicola abscessus</i>	0,04	0,24
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2,15	4,20
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4,17	20,43
<i>Prevotella scopus</i>	0,02	0,20
<i>Selenomonas sputigena</i>	0,11	0,43
<i>Streptococcus constellatus</i>	0,27	0,73
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0,07	0,17
<i>Tannerella forsythia</i>	0,48	4,34
<i>Treponema denticola</i>	0,34	1,80
<i>Treponema lecithinolyticum</i>	0,16	0,56
<i>Treponema medium</i>	0,27	1,53

TABLA 2. Especies bacterianas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa entre el G-Control y el G-Perio, siendo los valores porcentuales superiores en el G-Control ( $p < 0,05$ ,  $Q = 0,25$ ).

TABLA 3. Especies bacterianas que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa entre el G-Control y el G-Perio, siendo los valores porcentuales superiores en el G-Perio ( $p < 0,05$ ,  $Q = 0,25$ ).

*Fusobacterium* fue el género más abundante en la microbiota subgingival de los pacientes de ambos grupos (47,79 % - 32,00 %).

En términos de abundancia relativa, encontramos diferencias significativas en 20 géneros bacterianos entre los 2 grupos de estudio ( $p < 0,05$ ,  $Q = 0,20$ ).

En el G-Control se obtuvieron porcentajes de abundancia significativamente superiores con respecto a G-Perio para *Fusobacterium* (47,79 % vs. 32,00 %), *Streptococcus* (16,22 % vs. 3,91 %), *Leptotrichia* (3,30 % vs. 1,14 %), *Capnocytophaga* (2,53 % vs. 0,78 %), *Corynebacterium* (2,51 % vs. 0,12 %), *Veillonella*

(2,48 % vs. 0,54 %), *Neisseria* (1,26 % vs. 0,30 %), *Actinomyces* (1,00 % vs. 0,19 %) y *Johnsonella* (0,27 % vs. 0,13 %) (Figura 4A). En el G-Perio se obtuvieron porcentajes de abundancia significativamente superiores con respecto a G-Control para *Porphyromonas* (26,20 % vs. 4,91 %), *Tannerella* (5,36 % vs. 0,48 %), *Treponema* (4,21 % vs. 0,65 %), *Filifactor* (3,37 % vs. 0,62 %), *Peptostreptococcus* (1,52 % vs. 0,23 %), *Eubacterium* (1,35 % vs. 0,34 %), *Desulfobulbus* (0,70 % vs. 0,13 %; tendencia a la significación estadística,  $p = 0,060$ ), *Hallella* (0,45 % vs. 0,11 %), *Bulleidia* (0,33 % vs. 0,05 %), *Phocaeicola* (0,26 % vs. 0,05 %) y *Mogibacterium* (0,15 % vs. 0,01 %) (Figura 4B).

Queremos  
verte  
Sonreír

nuevo  
**Bexident**<sup>®</sup>  
BLANQUEANTE

**WHITENS & CARES**

Su tecnología Pro-Whitening Tech<sup>®</sup> genera una acción blanqueante, antimanchas y remineralizante fortaleciendo y protegiendo el esmalte desde los primeros días. Previene la sensibilidad dental asociada al uso de blanqueantes.



Colutorio 500ml CN 179340.9  
Pasta dentífrica 125ml CN 179342.3

**ISDIN**

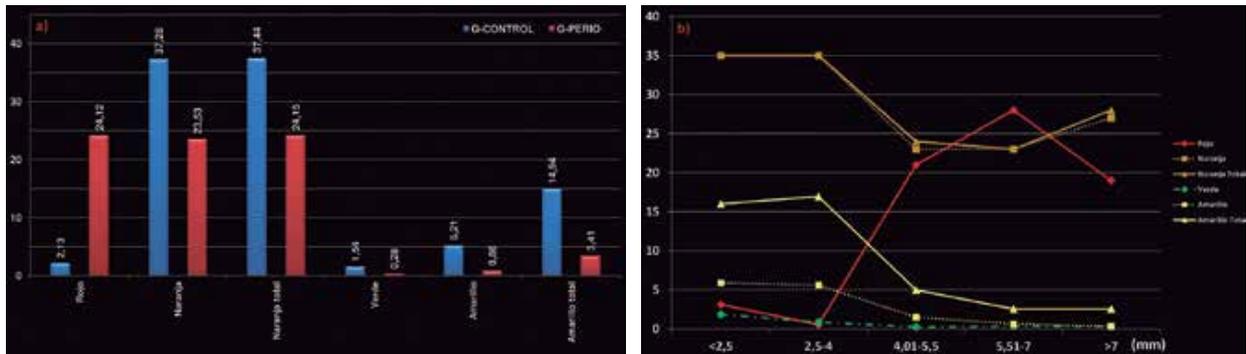


FIGURA 5a Y B. Abundancia relativa de los Complejos clásicos de Socransky en el G-Control y el G-Perio (a; todas las comparativas entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas;  $p < 0,05$ ;  $Q = 0,05$ ). Asociación (gráfico de tendencias) entre la abundancia relativa de los Complejos de Socransky y el parámetro clínico, profundidad de sondaje (b).

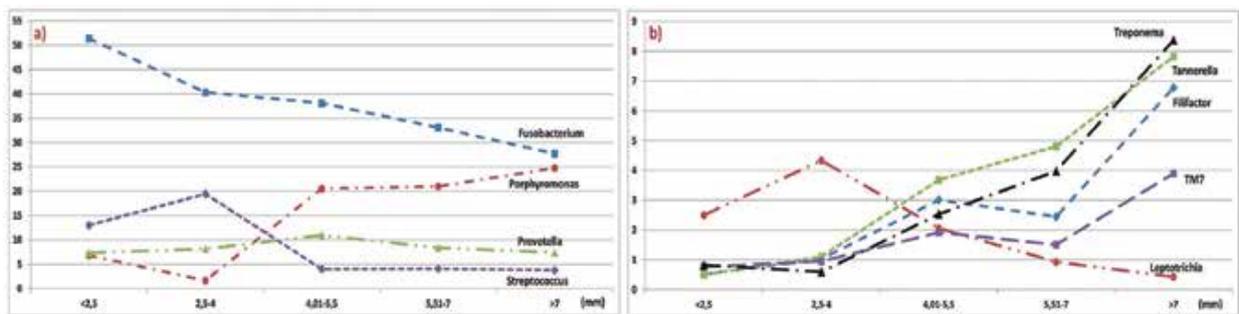


FIGURA 6a Y B. Asociación (gráfico de tendencias) entre la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos y el parámetro clínico, profundidad de sondaje.

A nivel-especie, se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de abundancia de 30 especies bacterianas entre el G-Control y el G-Perio ( $p < 0,05$ ,  $Q = 0,25$ ) (Tablas 2 y 3).

Se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de todos los Complejos de Socransky entre el G-Control y el G-Perio ( $p < 0,05$ ;  $Q = 0,05$ ) (Figura 5A). En el G-Perio, se detectó un predominio de los Complejos Rojo y Naranja (abundancia relativa = 24,12 %, 23,53 % y 24,15 % respectivamente), aunque solamente el Complejo Rojo mostró unos niveles superiores en el G-Perio, mientras que el resto de complejos fueron más abundantes en el G-Control.

### Relación entre la microbiota subgingival y los parámetros clínicos

Hubo 14 géneros bacterianos que mostraron correlaciones significativas con los parámetros clínicos asociados a la salud gingival/periodontitis (profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y/o sangrado al sondaje;  $p < 0,05$ ;  $Q = 0,20$ ). De estos, los géneros *Capnocytophaga*, *Streptococcus* y *Veillonella* presentaron asociaciones negativas con los 3 parámetros clínicos, mientras *Filifactor*, *Porphyromonas*, *Tannerella* y *Treponema*, asociaciones positivas con los 3 parámetros clínicos.

Se detectaron 25 especies bacterianas que mostraron correlaciones significativas con los parámetros clínicos asociados

a la salud gingival/periodontitis (profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y/o sangrado al sondaje;  $p < 0,05$ ;  $Q = 0,25$ ). De estas, las especies *Streptococcus pseudopneumoniae* y *Streptococcus sanguinis* presentaron asociaciones negativas con los 3 parámetros clínicos, y *Fusobacterium nucleatum* con la profundidad de sondaje y el sangrado. Las especies *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Treponema medium* presentaron asociaciones positivas con los 3 parámetros clínicos y *Filifactor alocis* con la profundidad de sondaje y el sangrado.

En relación a las correlaciones entre los Complejos clásicos de Socransky y los parámetros clínicos ( $p < 0,05$ ,  $Q = 0,05$ ), el Complejo Rojo presentó una fuerte asociación positiva con la profundidad de sondaje, la pérdida de inserción clínica y el sangrado al sondaje ( $\rho > 0,500$ ). Por el contrario, los Complejos Verde y Amarillo presentaron correlaciones negativas con los tres parámetros clínicos evaluados, siendo ésta de carácter fuerte con la profundidad de sondaje y la pérdida de inserción clínica ( $\rho > 0,500$ ).

En las Figuras 5B, 6 y 7 se muestran las asociaciones (gráfico de tendencias) observadas entre algunos de los géneros bacterianos y especies bacterianas comentadas anteriormente, así como entre los Complejos de Socransky, y el parámetro clínico más representativo de la enfermedad, la profundidad de sondaje.

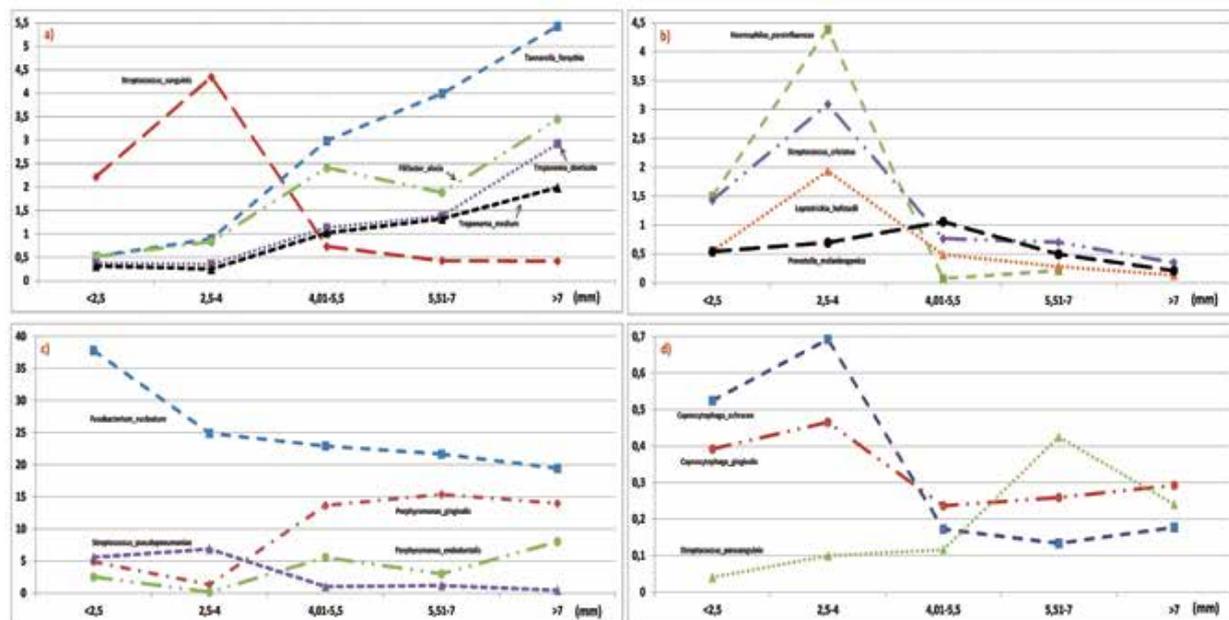


FIGURA 7a, B, C Y D. Asociación (gráfico de tendencias) entre la abundancia relativa de las principales especies bacterianas y el parámetro clínico, profundidad de sondaje.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio transversal de ecología bacteriana se ha evaluado y comparado la microbiota subgingival en la salud y en la periodontitis crónica usando una técnica metagenómica de alto rendimiento, la pirosecuenciación del gen ARN ribosomal 16S. Hasta el momento, aunque existen algunos estudios metagenómicos comparativos de salud vs. periodontitis usando esta técnica de secuenciación masiva<sup>16-21</sup> la mayoría de estos la aplicaron sobre un tamaño muestral bastante reducido<sup>17-20</sup>. Esto imposibilita el análisis de la asociación de los datos taxonómicos bacterianos con los parámetros clínicos que definen la progresión de la enfermedad. En el presente estudio, se analizó las muestras subgingivales procedentes de 50 pacientes (20 sanos y 30 periodontales), representando el primer análisis metagenómico realizado en España sobre la microbiota subgingival asociada a la periodontitis crónica.

### Diversidad y estructura de la microbiota subgingival: salud vs. periodontitis

Tradicionalmente, desde el punto de vista de la ecología bacteriana, se ha considerado que una comunidad más diversa supone un ecosistema más estable y saludable<sup>16</sup>. De hecho, una de las enfermedades orales más prevalentes, la caries, se caracteriza por un descenso de la diversidad bacteriana<sup>37</sup>. Por el contrario, en nuestro estudio, hemos detectado una mayor riqueza y diversidad bacteriana en los pacientes periodontales frente al grupo sano, lo cual coincide con los hallazgos aportados previamente por otros autores<sup>16-18</sup>. Esta mayor riqueza y diversidad podría ser consecuencia bien de un ambiente más rico en nutrientes (por ejemplo, procedentes de la

propia placa bacteriana) y/o de la imposibilidad de controlar el desequilibrio de la microbiota subgingival por parte de la respuesta inmunológica local. Posteriormente, hemos podido comprobar que esta mayor riqueza y diversidad bacteriana presente en la periodontitis crónica se asocia de forma positiva con la severidad de la inflamación periodontal (los pacientes periodontales con niveles medios de sangrado al sondaje >50% en las localizaciones muestreadas presentaron alrededor de 500 especies bacterianas más que aquellos periodontales con niveles ≤50%)<sup>38</sup>.

Coincidiendo con los hallazgos previos de Griffen et al.<sup>16</sup> y Abulesme et al.<sup>17</sup>, el ACoP (“Análisis de Coordinadas Principales”) reveló una estructura bacteriana significativamente diferente entre los dos grupos de estudio, siendo más homogénea en el grupo con periodontitis crónica, en consonancia con lo descrito por Chen et al. en una población de pacientes periodontales chinos<sup>21</sup>.

### Composición taxonómica de la microbiota subgingival: salud vs. periodontitis

Gracias a las técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento como la pirosecuenciación del gen ARNr 16S se han demostrado diferencias claras en la composición global de las comunidades bacterianas entre los pacientes con periodontitis y los sanos<sup>16-20</sup>. Estos resultados no solo han confirmado algunos de los publicados previamente utilizando otras técnicas moleculares, sino que han puesto de manifiesto nuevos hallazgos de interés en la etiología polimicrobiana de la periodontitis crónica.

En el presente estudio, el género más abundante en todas las muestras subgingivales fue *Fusobacterium*, tanto en la

salud como en la periodontitis. Esto apoya la afirmación de que una de las especies de este género, *F. nucleatum*, desempeña un papel fundamental en la formación del biofilm subgingival, haciendo de "puente" entre las bacterias<sup>39</sup>. Sin embargo, curiosamente, en nuestra serie, la abundancia relativa de esta especie fue significativamente mayor en el grupo de pacientes sanos. Esto contrasta con lo descrito por Socransky et al.<sup>10</sup>, quienes consideraron a *F. nucleatum* uno de los periodontopatógenos incluidos en el Complejo Naranja. Posteriormente, aplicando técnicas metagenómicas, Liu et al.<sup>19</sup> no detectaron diferencias significativas en la abundancia relativa de *Fusobacterium*, mientras que otros autores lo observaron significativamente aumentado en la periodontitis<sup>20</sup>.

Coincidiendo con datos metagenómicos publicados con anterioridad<sup>19,20</sup>, observamos al género *Streptococcus* relacionado con la salud gingival, ya que su abundancia relativa es mayor en el grupo de sujetos sanos. A pesar de esto, si nos vamos hasta el nivel de especie, resulta muy interesante apreciar como por ejemplo, los porcentajes de abundancia de las especies *S. intermedius* y *S. sanguinis* fueron significativamente mayores en los pacientes sanos, y por el contrario, *S. constellatus* y *S. parasanguinis* resultaron más abundantes en los pacientes con periodontitis crónica. Estas tendencias opuestas también se observaron en especies de otros géneros como *Porphyromonas*. Estos hallazgos reafirman la importancia de discriminar a los taxones hasta el nivel de especie, e incluso hasta el nivel de cepa, ya que diferentes especies/cepas pertenecientes a un mismo género bacteriano pueden ejercer distintas funciones, e incluso antagónicas, en la etiopatogenia de la periodontitis crónica<sup>40,41</sup>.

El género *Porphyromonas* estuvo presente tanto en el grupo control como en el grupo con periodontitis, pero su abundancia relativa fue significativamente mayor en los pacientes con la enfermedad, siendo el que se encuentra en mayor proporción, seguido de *Tannerella* y *Treponema*. Por consiguiente, estos periodontopatógenos considerados "clásicos" también cohabitan en condiciones de salud periodontal. Con estos hallazgos confirmamos así lo publicado previamente por la mayoría de los autores que aplicaron pirosecuenciación del gen ARNr 16S<sup>17,18,20</sup>. Sin embargo, Griffen et al.<sup>16</sup>, en su serie de pacientes sanos y periodontales norteamericanos, detectaron la especie *T. forsythia* en el puesto número 16 de abundancia relativa, mientras que Liu et al.<sup>19</sup> no encontraron al género *Porphyromonas* significativamente aumentado en los pacientes periodontales.

En líneas generales, las diferencias observadas en los trabajos metagenómicos en relación a los niveles de abundancia de diferentes géneros y especies bacterianas pueden ser atribuidas a la notable variabilidad inter-sujeto observada y al empleo de reducidos tamaños muestrales, que condicionan el análisis/poder estadístico de los resultados obtenidos. Además de estas limitaciones metodológicas, es importante señalar las posibles influencias demográficas y raciales en la

composición del microbioma subgingival asociado a la salud y a la periodontitis crónica, tal como se ha demostrado en muestras salivales de distintos orígenes geográficos<sup>42</sup>.

Hasta el momento, no hay ningún trabajo metagenómico del gen 16S ARNr en el que se haya analizado los resultados agrupando las especies identificadas mediante análisis bioinformático en los Complejos clásicos descritos por Socransky et al.<sup>10</sup>, por lo que nuestros hallazgos no han podido ser comparados con trabajos metodológicamente similares. Basándonos en nuestros resultados, corroboramos que en la periodontitis crónica hay una mayor abundancia del Complejo Rojo de Socransky, tal y como se promulgó inicialmente<sup>10</sup>. Sin embargo, en contraste con las aportaciones de Socransky et al.<sup>10</sup>, aunque el Complejo Naranja fue también muy abundante en los enfermos periodontales (con porcentajes similares a los observados en el Complejo Rojo), esta abundancia fue superior en los sujetos sanos, ocurriendo lo mismo con el resto de Complejos. Como mencionábamos antes, una de las especies incluidas en el Complejo Naranja, *F. nucleatum*, mostró una abundancia relativa mayor en los pacientes sanos. En cuanto al resto de bacterias del Complejo Naranja, solamente la especie *S. constellatus*, presentó mayor proporción en los pacientes periodontales. La detección de una abundancia relativa mayor en la salud también ocurrió con otras especies como *C. gingivalis*, *C. sputigena* y *C. ochracea* (Complejo Verde), *S. sanguis* (Complejo Amarillo) y *V. parvula* (Complejo Púrpura). Por consiguiente, en términos de abundancia, todas estas especies podrían ser consideradas asociadas a la salud gingival. Estos hallazgos sugieren el interés de esclarecer principalmente el papel etiopatogénico del clásico Complejo Naranja en la periodontitis crónica, mediante el empleo de diferentes técnicas moleculares.

Gracias a las técnicas de alto rendimiento, se ha conseguido identificar otras especies "de baja abundancia" implicadas en la periodontitis crónica, que mediante otras técnicas no se habían detectado previamente. En este sentido, actualmente la comunidad científica considera fundamental el estudio de las bacterias "de baja abundancia" para el avance en el entendimiento de la etiopatogenia de las enfermedades polimicrobianas<sup>43</sup>. Específicamente, nos vamos a centrar en el caso de *F. alocis*, una especie gram-positiva relativamente desconocida hasta el uso de la secuenciación masiva y que, tanto en nuestro estudio como en otros, se ha encontrado en un porcentaje significativamente mayor en los pacientes periodontales<sup>16,18,20,21</sup>. Estos resultados sobre la implicación de esta bacteria en la periodontitis crónica están en consonancia con los publicados por otros autores que utilizaron diferentes diseños metodológicos. Así, Moffatt et al.<sup>44</sup>, en un modelo de cultivo celular, y Wang et al.<sup>45</sup>, en un modelo de experimentación animal, observaron que la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF) estaba estimulada por la presencia de una infección por *F. alocis*.

Queremos  
verte  
Sonreír

nuevo  
**Bexident**<sup>®</sup>  
FRESH BREATH

24H DE ALIENTO FRESCO

Su tecnología VSC Neutralizing Tech<sup>®</sup> neutraliza las bacterias y bloquea los compuestos sulfurados volátiles causantes del mal aliento. Proporciona un aliento fresco y duradero con una acción prolongada de hasta 24h. Ayuda a controlar eficazmente la sequedad bucal.



Colutorio 500ml CN 177989.2  
Spray 15 ml CN 177990.8

**ISDIN**

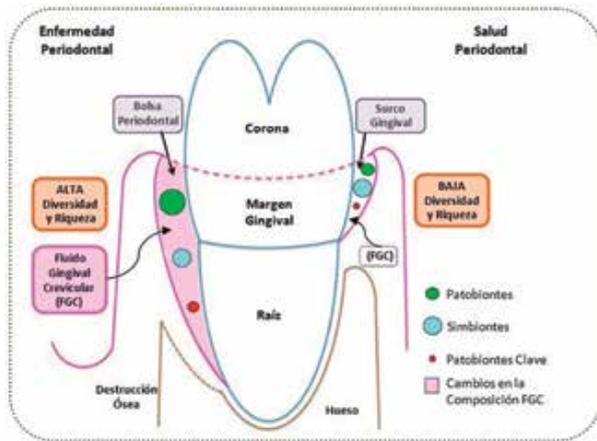


FIGURA 8. Nuevo modelo de patogénesis de la periodontitis crónica: Modelo de sinergia polimicrobiana y disbiosis. Adaptado de Costalonga y Herzberg<sup>49</sup>.

**Relación entre la microbiota subgingival y los parámetros clínicos**

Como hemos mencionado con anterioridad, son escasos los trabajos metagenómicos que relacionan los datos taxonómicos con los parámetros clínicos que definen la progresión de la enfermedad, y estos solo se centraron en el análisis de pacientes periodontales<sup>16,17</sup>.

Nuestros resultados sobre la relación entre las bacterias clásicamente asociadas a la periodontitis y los parámetros clínicos corroboran los publicados por Socransky et al.<sup>10</sup> quienes encontraron una fuerte asociación entre las especies del Complejo Rojo con la profundidad de sondaje y el sangrado al sondaje. Sin embargo, una de las especies incluidas en el Complejo Naranja y asociada a la profundidad de sondaje, *F. nucleatum*<sup>10</sup> en nuestra serie mostró una correlación negativa con este parámetro clínico y el sangrado al sondaje. Esto plantea dudas sobre cuál es el papel de esta especie en la patogénesis de la periodontitis, respecto a su actividad “comensal” o “patógena”. Por otra parte, además de los periodontopatógenos “establecidos”, encontramos otras especies “nuevas” asociadas positivamente a los parámetros clínicos, como *F. alocis*, lo que contribuye a confirmar su implicación en el desarrollo de la enfermedad.

Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de Hajishengallis y Lamont<sup>46</sup>, quienes recientemente propusieron un nuevo modelo de patogénesis de la periodontitis, el modelo PSD (“polymicrobial synergy and dysbiosis model”). Este modelo sostiene que esta enfermedad es iniciada por un sinergismo y una disbiosis de la microbiota subgingival, en contraposición con la visión clásica de que la enfermedad está causada por una serie de periodontopatógenos concretos, como el Complejo Rojo. Este modelo supone un cambio de paradigma en la identificación del papel etiopatogénico de la microbiota, y los conceptos clásicos “comensal” y “patógeno” deberían ser sustituidos por “simbioses” y “patobiontes”<sup>46</sup>.

Los “patobiontes” serían bacterias presentes en bajas proporciones en condiciones de salud pero que con cambios ambientales pueden aumentar en proporción y desencadenar la enfermedad. Además, también se debe subrayar la reciente identificación de los denominados patobiontes “clave”. Los patobiontes “clave” serían bacterias capaces de modular la respuesta del huésped, impidiendo la acción del sistema inmune y elevando la virulencia de toda la comunidad bacteriana, mediante una comunicación interactiva con otros patobiontes, lo cual ha sido demostrado experimentalmente para *P. gingivalis*<sup>47</sup>. En este sentido, en una serie de pacientes periodontales publicada previamente por nuestro grupo<sup>38</sup>, observamos que, a diferencia de otras especies bacterianas, *P. gingivalis* mostraba una abundancia considerable en todos los pacientes (en torno al 15 %) independientemente de parámetros clínicos que definen la severidad de la enfermedad, como la presencia de sangrado al sondaje. Esto constata el conocido papel de esta bacteria como patobionte “clave”. En consecuencia, la sinergia polimicrobiana y disbiótica será la responsable de los cambios en las complejas interacciones bacteria-huésped que inducirán el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal (Figura 8)<sup>48,49</sup>.

Actualmente, son necesarios más estudios metagenómicos y metatranscriptómicos, sobre todo de carácter longitudinal e intervencionista, para entender más profundamente los cambios composicionales y funcionales de las comunidades microbianas subgingivales en la salud y en la enfermedad, sobre la base del modelo PSD, así como su interacción con el hospedador. Estos avances en la etiopatogenia permitirán plantear mejoras en las estrategias preventivas y terapéuticas de las enfermedades periodontales.

**CONCLUSIÓN**

La pirosecuenciación del gen ARN ribosomal 16S reveló una mayor diversidad y diferente estructura y composición de la microbiota subgingival en la periodontitis crónica. Se corroboró que esta enfermedad no puede ser considerada una enfermedad infecciosa en el sentido clásico del término, sino que está asociada a una disbiosis polimicrobiana. Esta disbiosis está caracterizada no solo por una mayor implicación de los patobiontes “establecidos”, sino también por la coexistencia de otros patobiontes con papel desconocido, como *Filifactor alocis*, que de forma conjunta repercuten en el desarrollo de la patología.

Al igual que ha sido propuesto para el caso de la caries<sup>50</sup>, si la periodontitis crónica no es estrictamente una enfermedad infecciosa, las estrategias antimicrobianas habituales pueden representar una “actuación demasiado agresiva” para el ecosistema bacteriano, y nuevos tratamientos basados en restablecer el equilibrio de la microbiota, como el uso de prebióticos, deben ser evaluados. Se constata la potencial aplicación del análisis masivo del microbioma subgingival como indicador biológico en el diagnóstico y pronóstico de la periodontitis crónica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dentino A, Lee S, Mailhot J, et al. Principles of Periodontology. *Periodontol* 2000 2013;61:16-53.
- Al-Harathi LS, Cullinan MP, Leichter JW, et al. The impact of periodontitis on oral health-related quality of life: a review of the evidence from observational studies. *Aust Dent J* 2013; 58: 274-7.
- Llodra Calvo JC. Encuesta de Salud Oral en España 2010. *RCOE* 2012; 17: 13-41.
- Carramolino-Cuellar E, Tomás I, Jiménez-Soriano Y. Relationship between the oral cavity and cardiovascular diseases and metabolic syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19: 289-94.
- Stanko P, Izakovicova-Holla L. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014; 158: 35-8.
- Bansal M, Khatri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases-a review. *J Med Life* 2013; 6: 244-8.
- Kobayashi T, Yoshie H. Host responses in the link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Curr Oral Health Rep* 2015; 2: 1-8.
- Singhroo SK, Harding A, Simmons T, et al. Oral inflammation, tooth loss, risk factors and association with progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2014; 42: 723-37.
- Teles R, Teles F, Frias-López J, et al. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol* 2000 2013; 62: 95-162.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-44.
- Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 1993; 7: 113-23.
- Nyvad B, Crielaard W, Mira A, et al. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res* 2013; 47: 89-102.
- Human Microbiome Project Consortium. *Nature* 2012; 486: 215-21.
- Human Microbiome Project Consortium. *Nature* 2012; 486: 207-14.
- Siqueira JE, Fouad AF, Rôças IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol* 2012; 4: 10743.
- Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* 2012; 6: 1176-85.
- Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013; 7: 1016-25.
- Li Y, He J, He Z, et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J* 2014;8:1879-91.
- Liu B, Faller LL, Klitgord N, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS ONE* 2012; 7: e37919.
- Park OJ, Yi H, Jeon JH, et al. Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *J Dent Res* 2015; 94: 921-27.
- Chen H, Liu Y, Zhang M, et al. A *Filifactor alocis*-centered co-occurrence group associates with periodontitis across different oral habitats. *Sci Rep* 2015; 5: 9053.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
- Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78: 1387-99.
- Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, et al. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res* 2013; 92: 616-21.
- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J* 2012; 6: 46-56.
- Benítez-Páez A, Álvarez M, Belda-Ferre P, et al. Detection of transient bacteraemia following dental extractions by 16S rDNA pyrosequencing: a pilot study. *PLoS ONE* 2013; 8: e57782.
- Blankenberg D, Hillman-Jackson J. Analysis of next-generation sequencing data using Galaxy. *Methods Mol Biol* 2014; 1150: 21-43.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 7537-41.
- Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 2006; 22: 1658-59.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12115-120.
- Holland SM. Analytic Rarefaction 1.3. Athens: University of Georgia. 2003. Disponible online en: <http://strata.uga.edu/software/anRareReadme.html>
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: D141-45.
- Lozupone C, Hamady M, Knight R. UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 371.
- Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 1576-85.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-402.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B* 1995; 57: 289-300.
- Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res* 2013; 47: 591-600.
- Camelo-Castillo A, Novoa L, Balsa-Castro C, Blanco J, Mira A, Tomás I. Relationship between periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation by 16S pyrosequencing. *J Clin Periodontol* 2015; 42: 1074-82.
- Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2011; 13: 25-36.
- Eren AM, Maignien L, Sul WJ, et al. Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods Ecol Evol* 2013; 4: 1111-19.
- Eren AM, Borisy GC, Huse SM, Mark Welch JL. Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E2875-84.
- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 2009; 19: 636-43.
- Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 2011; 10: 497-506.
- Moffatt CE, Whitmore SE, Griffen AL, et al. *Filifactor alocis* interactions with gingival epithelial cells. *Mol Oral Microbiol* 2011; 26: 365-73.
- Wang Q, Jorwani R, Le J, et al. *Filifactor alocis* infection and inflammatory responses in the mouse subcutaneous chamber model. *Infect Immun* 2014; 82: 1205-12.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 2012; 27: 409-19.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 717-25.
- Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med* 2015; 21: 172-83.
- Costaloga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* 2014; 162(2 Pt A): 22-38.
- Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol* 2015; 23: 76-82.