

**Perfil de la microbiota de la biopelícula subgingival en periodontitis
por secuenciación genómica. Una revisión sistemática**

**BRYAN ANTONIO CASTRO VILLALOBOS
FABIO ARTURO MORALES MORENO**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE PERIODONCIA Y MEDICINA ORAL - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.- JULIO 2021**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Periodoncia y Medicina Oral
Título:	Perfil de la microbiota de la biopelícula subgingival en periodontitis por secuenciación genómica. Una revisión sistemática
Grupo de Investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO
Línea de investigación:	Medicina periodontal
Institución(es) participante(s):	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque
Tipo de investigación:	Posgrado de Periodoncia y medicina oral /Grupo UIBO
Estudiantes/ residentes:	Brian Antonio Castro Villalobos; Fabio Arturo Morales Moreno
Director:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Codirector/ Asesor metodológico:	Dr. Leandro Chambrone Dra. Diana Castillo Dra. Yineth Neuta

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
DR. MIGUEL VARGAS DEL CAMPO	Director Programa de Periodoncia y Medicina Oral
DRA. MARIA ALEJANDRA SABOGAL	Coordinadora Programa de Periodoncia y Medicina Oral

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
	Pág.
Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Objetivos	8
3.1 Objetivo general	8
3.2 Objetivos específicos	8
4. Metodología del proyecto	9
4.1. Tipo de estudio	9
4.2. Muestra	9
4.3. Criterios de selección de artículos	9
5. Materiales y métodos	10
5.1. Palabras claves	10
5.2. Bases de datos	10
5.3. Estrategia de búsqueda	10
5.4. Extracción de datos	12
5.5. Evaluación y calidad metodológica	12
5.6. Análisis estadístico	12
6. Resultados	13
6.1. Resultados de la búsqueda	13
6.2. Resultados de la búsqueda y descripción de los estudios incluidos	13
6.3. Estudios incluidos	20
7. Discusión	21
7.1. Microbiota de la biopelícula subgingival en periodontitis y periodonto sano	25
8. Conclusión	27
9. Propiedad Intelectual	28
9.1. Derechos de Autor	28
9.2. Implicaciones para el derecho de autor de nuevas creaciones y de nuevos derechos	28
10. Referencias Bibliográficas	31

LISTADO DE TABLAS

		Págs.
Tabla 1	Formato PICO	10
Tabla 2	Estrategia de Búsqueda	11
Tabla 3	Características de los estudios incluidos	15

LISTADO DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1 Diagrama de flujo de los artículos analizados durante el proceso de revisión.	13

RESUMEN

Perfil de la microbiota de la biopelícula subgingival en periodontitis por secuenciación genómica. Una sistemática revisión

Antecedentes: En esta revisión sistemática se quiere evaluar los diferentes perfiles microbiológicos en pacientes con periodontitis y salud periodontal teniendo como base estudios que evaluaron microbiomas completos teniendo en cuenta el uso de la secuenciación 16S y pirosecuenciación para establecer sus similitudes y diferencias. **Métodos:** Se realizaron búsquedas en sistemas de análisis y recuperación de literatura médica en línea a través de PubMed y EMBASE, sin restricciones de idioma hasta el 31 de agosto de 2020. En los estudios observacionales que evaluaron microbiomas completos de periodontitis en comparación con salud periodontal se consideraron elegibles para su inclusión; además, para su inclusión estos estudios debían evaluar estos microbiomas mediante el uso de técnicas como la secuenciación 16S y pirosecuenciación. **Resultados:** De 22 artículos potencialmente elegibles, 11 fueron incluidos en este estudio. Estos evaluaron microbiomas completos de periodontitis versus salud. Cuatro artículos fueron excluidos al no cumplir con las técnicas para la evaluación del microbioma. En los dientes con periodontitis fueron abundantes los phyla Bacteroidetes, Fusobacteria, Synergistetes y Spirochaetes y niveles elevados de Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Fretibacterium fastidiosum, Tanarella forshythia, Rothia, Filifactor y Treponema. En cambio en dientes periodontalmente sanos se encontró los phyla Firmicutes y Proteobacteria y la presencia abundante de los géneros Streptococcus, Capnocytophaga, Leptotrichia y Haemophilus. **Conclusiones:** La periodontitis es una infección heterogénea caracterizada por la presencia de microorganismos del complejo rojo como Filifactor y espiroquetas. Sin embargo, las técnicas de secuenciación han permitido identificar otros microorganismos no cultivables asociados a la periodontitis. **Palabras claves:** Periodontitis, Gingivitis, Salud periodontal, Microbioma, Pirosecuenciación, Análisis de secuenciación, Genómica

ABSTRACT

Profile of the subgingival biofilm microbiota in periodontitis by genomic sequencing. A systematic review

BACKGROUND: In this systematic review, we want to evaluate the different microbiological profiles in patients with periodontitis and periodontal health from studies that evaluated microbiomes taking into account the use of 16S sequencing and pyrosequencing to set up their similarities and differences.

METHODS: Online medical literature recovery and analysis systems were searched through PubMed and EMBASE, were searched without language restrictions through August 31, 2020. Observational studies evaluating complete microbiomes of periodontitis compared to periodontal health were considered eligible for inclusion; Furthermore, for inclusion, these studies had to evaluate these microbiomes using techniques such as 16S sequencing and pyrosequencing.

RESULTS: Of 22 potentially eligible articles, 11 were included in this study. These evaluated microbiomes of periodontitis versus health using 16S DNA gene sequencing. Four articles were excluded because they did not comply with the techniques for the evaluation of the microbiome. In teeth with periodontitis, the phyla Bacteroidetes, Fusobacteria, Synergistetes and Spirochaetes were abundant and elevated levels of Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Tanarella forshytha, Rothia, Filifactor alocis, Fretibacterium fastidiosum and Treponema were observed. On the other hand, in periodontal healthy teeth, the phyla Firmicutes and Proteobacteria were found and the abundant presence of the genders Streptococcus, Capnocytophaga, Leptotrichia and Haemophilus.

CONCLUSIONS: Periodontitis is a heterogeneous infection characterized by the presence of red complex microorganisms. However, sequencing techniques have made it possible to identify other not cultivable microorganisms associated with periodontitis.

KEY WORDS: Periodontitis, Gingivitis, periodontal health, Microbiome, pyrosequencing, Sequence Analyses, Genomics.

Introducción

La cavidad oral es un entorno en el que las bacterias pueden almacenar e intercambiar su material genético. Dos de las enfermedades humanas más comunes, caries y enfermedad periodontal son el resultado de la acumulación de biopelículas bacterianas en las diferentes superficies orales. La salud oral es el resultado de un equilibrio entre el microbioma residente y los sistemas de defensa del hospedador, cuando se altera este equilibrio, los microorganismos implicados en esta pueden llegar a ser responsables de diversas infecciones locales. (Rocas et al 2012).

La enfermedad periodontal, es una enfermedad inflamatoria - infecciosa localizada, causada por los microorganismos presentes en la placa dental, que da como resultado la destrucción progresiva de los tejidos de sostén de los dientes, es decir, el tejido gingival, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar, llevando a que se presente la ruptura de las fibras de colágeno del ligamento periodontal, dando lugar a la formación de una bolsa periodontal entre la encía y el diente. Esto involucra una serie de procesos reversibles (gingivitis, que es la inflamación limitada a la encía) como los irreversibles (periodontitis, donde la inflamación se extiende y afecta al hueso alveolar).(SEPA 2018)

Por esto mismo, la metagenómica permitirá a nivel de la cavidad oral analizar y comprender las complejas comunidades e interacciones de los microorganismos. También las técnicas genómicas permitirán conocer cómo se da la interacción entre el sistema inmune del huésped con la microbiota oral y explicar su relación con la salud o la enfermedad oral. El entender el microbioma oral es una tarea compleja, ya que se pueden encontrar una gran variedad de hábitats, las especies del género *Streptococcus* se encuentran en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua. Las especies del género *Actinomyces* se encuentran a nivel supra y subgingival. También puede existir colonización por complejos bacterianos constituidos por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. Estudios recientes han demostrado que la mayoría de los microorganismos orales son cultivables; que el microbioma oral es mucho más diverso de lo que se pensaba; y que las infecciones orales son de naturaleza polimicrobiana. (Wang et al. 2013)

Este conocimiento llevará a los odontólogos a convertir al microbioma oral en una herramienta clínica habitual para conocer la susceptibilidad de sus pacientes de padecer ciertas enfermedades orales

2. Marco teórico

La periodontitis es una enfermedad con características inflamatorias, causada por la interrupción de los procesos homeostáticos dado por los cambios en la composición del microbioma oral que está en sinergia con una respuesta inmune inapropiada del huésped. Los principales factores de riesgo que llevan a la progresión de la enfermedad son: los microorganismos de la biopelícula, factores genéticos y ambientales como el consumo de cigarrillos; puede llegar a estar relacionada debido a enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus y la osteoporosis. Tiene una alta prevalencia entre la población, cerca del 90% de los pacientes presentan gingivitis o periodontitis. En los estudios evaluados se observó que la prevalencia de periodontitis crónica es de alrededor del 30% y además de esto se da un incremento exponencial con la edad, es decir, a mayor edad la extensión y severidad de la pérdida de inserción aumenta, llevando en muchos casos a la pérdida dental. Otro punto a tener en cuenta es la prevalencia de la enfermedad periodontal en diferentes países ya que esta difiere entre estos.(Bartold et al. 2000)

El microbioma oral consta de más de 600 taxones diferentes a nivel de especie. En los últimos años, la evidencia nos muestra que el microbioma oral se ha estado estudiando y analizando ampliamente utilizando diferentes métodos de cultivo, pero se ha observado que una gran parte del microbioma está compuesto por microorganismos que no son cultivables.(Griffen et al. 2012)

Por esto mismo, en los últimos estudios se han aplicado técnicas de biología molecular como, por ejemplo, métodos de secuenciación de próxima generación. Como resultado, siguió desarrollándose nuestra comprensión de la patogenia de la periodontitis. Con la ayuda de estas nuevas herramientas se dan nuevos paradigmas que destacan la interacción entre cambios complejos en el microbioma y la respuesta inmune innata y adaptativa de cada individuo(Hajishengallis et al. 2014), como en el modelo de sinergia polimicrobiana y disbiosis de Lamont y Hajishengallis, de se postuló que las comunidades microbianas coordinan su trabajo de acuerdo con la respuesta inmune del huésped para inducir enfermedades inflamatorias. En la periodontitis, los periodontopatógenos , como *P. gingivalis*, pueden iniciar una interrupción en la homeostasis (Lamont et al. 2015) y los

patógenos accesorios pueden promover una mayor colonización de periodontopatógenos. Otras bacterias actúan como los denominados patobiontes en esta disbiosis, ya que apoyan los procesos inflamatorios destructivos al influir en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Deng et al. 2017).

En los estudios evaluados se utilizaron métodos de secuenciación o pirosecuenciación de próxima generación para estudiar las diferencias entre los perfiles microbianos en pacientes con periodontitis y pacientes periodontalmente sanos donde se observó que los mecanismos de interacción microbiana son relativamente estables y no se alteran a presentar casos de periodontitis. Además, se encontró que diferentes funciones microbianas y vías metabólicas están involucradas en la enfermedad periodontal crónica (Kirst et al. 2015).

2.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad que se caracteriza por ser una inflamación mediada por el huésped asociada a microorganismos que llevan a la pérdida de la inserción periodontal, se define como la pérdida de inserción clínica interdental detectable en 2 o más dientes no adyacentes, o la pérdida de inserción clínica vestibular de ≥ 3 mm con bolsas periodontales de > 3 mm en 2 o más dientes. La progresión de esta depende de los cambios disbióticos en el microbioma en respuesta a los productos inflamatorios gingivales y de la degradación tisular; su fisiopatología se caracteriza por sus vías moleculares que en última instancia conducen a la activación de proteinasas derivadas del huésped que favorecen la pérdida de las fibras del ligamento periodontal, la migración apical del epitelio de unión y la propagación apical de la biopelícula bacteriana a lo largo de la superficie de la raíz.

Durante la enfermedad periodontal, las comunidades bacterianas expresan un cambio profundo caracterizado por el enriquecimiento de taxones anaeróbicos en su gran mayoría gram(-). Varias especies que se han asociado clásicamente con periodontitis están sistemáticamente presentes como *P. gingivalis*, *F. alocis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola* y *P. micra*, entre otras. Otros taxones no cultivables presentes en periodontitis son *Treponema* sp HMT 237, *Fretibacterium* sp HMT 360, *Fretibacterium* sp HMT 361 y *Saccharibacteria* (TM7) [G1] HMT 349.(Tonetti et al. 2018)

2.2. *Tannerella forsythia*

Es un miembro gramnegativo anaeróbico de la Cytophaga-Bacteroides familia que fue descrita por Sakamoto et al, este microorganismo se asocia con mayor frecuencia en niveles más altos en gingivitis, periodontitis crónica y agresiva. Varios estudios han asociado a *T. forsythia* en la progresión de la pérdida de inserción clínica asociada a la periodontitis. Además, estudios recientes han sugerido que *T.forsythia* esta asociado a periodontitis en mujeres con sobrepeso que en mujeres con peso normal.(Tanner et al. 2006)

A pesar de la evidencia que asocia a *T. forsythia* en la patogénesis, esta bacteria sigue siendo un organismo poco estudiado. Aunque *T. forsythia* es el único miembro del nuevo género *Tannerella* , los filotipos orales no cultivados BU045, BU063, 97 y 997 son sus parientes más cercanos; estos tienen una estructura segmentada en forma de bastón largo y, aunque se encuentran con frecuencia en varias placas asociadas a la enfermedad periodontal, están presentes solo en pocas cantidades, no proliferan a altas densidades y, por lo tanto, no se consideran relevantes para la patogenia de la enfermedad.(Sharma et al. 2010)

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

Es una bacteria gramnegativa; hace parte del grupo de *Bacteroides* negro pigmentadas estas forman colonias de color marrón oscuro en placas de agar sangre. La *P. gingivalis* es capaz de producir una serie de factores de virulencia como la colagenasa, una serie de proteasas, hemolisinas, endotoxinas, ácidos grasos, amoniaco, sulfuro de hidrógeno, indol y otros; además, esta es capaz de inhibir la migración polimorfonuclear a través de la barrera endotelial. Está presente en pacientes con enfermedad periodontal, pero en cantidades reducidas, en comparación con pacientes que tienen formas agresivas de esta enfermedad.(Fiorillo et al. 2019)

La *P. gingivalis* es capaz de atacar las células epiteliales de la mucosa gingival y células endoteliales, esto debido al uso de fimbrias por parte de la bacteria. Entre los primeros colonizadores reconocemos el *Streptococcus oralis*; el *Streptococcus mitis*; *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguis*. Posteriormente se produce un complejo proceso de

agregación bacteriana hasta el *Fusobacterium nucleatum*, que garantiza, directamente o mediante *Treponema denticola*, la adhesión de *P. gingivalis* siendo este un colonizador tardío, como *Actinomyces actinomycetemcomitans*. También se debe enfatizar que las causas de la enfermedad periodontal pueden ser múltiples. Algunos factores, como los biomecánicos, pueden tener un papel importante en el curso de esta patología multifactorial. (Fiorillo et al. 2019)

2.4 *Fusobacterium nucleatum*

Esta bacteria pertenece a la familia Bacteroidaceae y es un microorganismo dominante dentro del periodonto, es una especie anaerobia gram negativa del filo *Fusobacterium*, dominante en las biopelículas y las enfermedades infecciosas humanas. Es una especie central en las interacciones entre especies grampositivas y gramnegativas que son importantes en la colonización de biopelículas, y contribuye a las condiciones reductoras necesarias para la aparición de anaerobios intolerantes al oxígeno y se considera como un colonizador intermedio.

La *F. nucleatum* es también una de las pocas especies orales que se asocia con sitios de periodontitis, y que aumenta en número en ellos, no es responsable de la enfermedad periodontal destructiva, que es una de las principales causas de pérdida de dientes. Es una de las especies orales más comunes aisladas en infecciones extraorales como abscesos sanguíneos, cerebrales, torácicos, pulmonares, hepáticos, articulares, abdominales, obstétricos y ginecológicos. Además, se ha asociado con complicaciones del embarazo, incluido el parto de bebés prematuros de bajo peso al nacer. Por tanto, *F. nucleatum* es un patógeno importante en las infecciones humanas, incluidas varias infecciones con un impacto social real. (Signat et al. 2011)

2.5 *Filifactor alocis*

Es una bacteria anaerobia grampositiva, es un indicador de la enfermedad periodontal. Sus características patogénicas son importantes por su capacidad para sobrevivir en ambientes ricos en estrés oxidativo como lo son las bolsas periodontales y de esta manera alterar

significativamente la dinámica de la comunidad microbiana formando biopelículas e interactuando con varias bacterias orales.

Esta bacteria presenta una resistencia comparativa al estrés oxidativo, una producción de proteasas y colagenasas que pueden causar daño estructural a las células del huésped y la desregulación del sistema inmunológico, permitiendo así que se de su desarrollo para colonizar, sobrevivir y competir con otros patógenos tradicionales en el entorno inflamatorio de la bolsa periodontal.(Chen et al. 2015)

2.6 *Parvimonas micra*

Esta bacteria es un coco grampositivo anaerobio que con frecuencia se aísla de lesiones periapicales, periodontitis crónica, periimplantitis y ocasionalmente en infecciones polimicrobianas graves, como las en las regiones cerebral, peritoneal, abdominal y pélvica. Es importante resaltar que *P. micra* es una de las principales causas de periodontitis apical y se ve involucrada en el desarrollo y progresión de la periodontitis crónica y expresa actividad hialuronidasa.

Además libera compuestos de azufre volátiles de la l- cisteína, que representan factores de virulencia potenciales de este microorganismo.(Horiuchi et al. 2020)

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar el perfil de la microbiota subgingival en pacientes sistémicamente sanos con periodontitis mediante técnicas de secuenciación genómica.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar los perfiles de la microbiota subgingival en pacientes sistémicamente sanos con periodontitis y sin enfermedad periodontal
- Identificar los phylos y especies de mayor abundancia en la microbiota subgingival en pacientes sistémicamente sanos con periodontitis mediante técnicas de secuenciación genómica.

4. Metodología del proyecto

4.1 Tipo de estudio

Estudio - Revisión narrativa - Revisión sistemática

4.2 Muestra

En total, se incluyeron 11 estudios tipo cohorte - casos y control, donde se evaluaba el microbioma subgingival en pacientes con periodontitis y pacientes periodontalmente sanos. Encontrados en búsquedas de la base de datos EMBASE, hasta el hasta el 31 de agosto de 2020

4.3 Criterios de selección de artículos

En esta revisión se incluyeron todos los artículos que cumplieran con los siguientes criterios: estudios en humanos, sin restricción de idiomas, estudios tipo cohorte - casos y control, que evaluaran el microbioma subgingival en pacientes con periodontitis y pacientes periodontalmente sanos, y que caracterizaron el microbioma por 16S y metagenómica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez elegido el tema de revisión, se estructuró el formato PICO teniendo en cuenta los siguientes criterios. (Tabla 1)

Tabla 1. Formato PICO

Elementos PICO	
Paciente o problema.	Microbioma
Exposición.	Paciente con periodontitis
Comparación:	Paciente sano
Outcome (desenlace/resultados)	Diversidad (alfa o beta); OTUS (filos y especies); genes

Posteriormente, se estableció la pregunta de investigación que responde al tema propuesto inicialmente:

¿Cuál es la diferencia en el microbioma en pacientes con periodontitis y salud periodontal?;

¿Existe diferencia en la caracterización del microbioma por 16S y metagenómica?

5.1 Palabras claves:

Se establecieron temas y términos alternativos a partir de la pregunta PICO para iniciar la búsqueda de la información. Estos temas fueron: “Periodontitis” OR “Aggressive Periodontitis” OR “Chronic Periodontitis” OR “Gingivitis” OR “Gingivitides” OR “Oral Health” OR “Periodontal health” OR “Health” OR “Oral” OR “Microbiome” OR “Sequence Analyses” OR “Genomics” OR “Metagenomics” OR “Community Genomics” OR “High Throughput Nucleotide Sequencing” OR “pyrosequencing” OR “Complete Genome Sequencing”

5.2 Bases de datos

PubMed

5.3 Estrategias de búsqueda

Se establecieron 5 diferentes estrategias de búsqueda, se desarrollaron estrategias de búsqueda detalladas para EMBASE (base de datos de Excerpta Medica) sin restricción de idioma.

Se buscó en las bases de datos hasta el 31 de agosto de 2020, utilizando los términos MeSH (Medical Subject Headings), palabras clave y otros términos gratuitos, y los operadores booleanos (OR, AND) se usaron para combinar búsquedas. Se desarrollaron estrategias de búsqueda detalladas para la base de datos buscada en base a la siguiente estrategia de búsqueda presentada (Tabla 2)

Tabla 2. Estrategia de Búsqueda

No	BUSQUEDA	RESULTADOS
#5	#1 AND #2 AND #3 AND #4	17
#4	(((((((Microbiome) OR (Sequence Analyses)) OR (Genomics)) OR (Metagenomics)) OR (Community Genomics)) OR (High Throughput Nucleotide Sequencing)) OR (pyrosequencing)) OR (Complete Genome Sequencing)	2,076,670
#3	(((Oral Health) OR (periodontal health)) OR (Health)) OR (Oral)	5,961,938
#2	(Gingivitis) OR (Gingivitides)	58,716
#1	((Periodontitis) OR (Aggressive Periodontitis)) OR (Chronic Periodontitis)	110,925

De esta búsqueda se obtuvieron los artículos seleccionados que posteriormente fueron evaluados con la modificación de una lista de verificación con la calidad metodológica y el rigor científico. Con este proceso se buscaron los criterios de inclusión/exclusión, con especial énfasis en el diseño del estudio y el tiempo de seguimiento.

En la segunda etapa de selección, se adquirieron todos los artículos en texto completo identificados durante la primera etapa. Durante este procedimiento, los estudios preseleccionados fueron evaluados de acuerdo a los criterios de inclusión mencionados anteriormente.

5.4 Extracción de datos

Dos revisores independientes examinaron los títulos, resúmenes y textos completos de los artículos para la búsqueda PUBMED. Los desacuerdos en la selección entre los revisores se resolvieron mediante discusión. Los siguientes datos fueron extraídos y registrados por duplicado: 1) cita; 2) estado de publicación; 3) año de publicación; 4) diseño del estudio; 5) características de los participantes; 6) Técnica de secuenciación ; y 7) Microorganismos evaluados y conclusiones. Un experto en microbiología revisó métodos microbianos en estudios con métodos moleculares, incluida la secuenciación de ADN.

5.5 Evaluación y calidad metodológica

La calidad metodológica de los estudios se evaluó mediante la escala Newcastle-Ottawa adaptada por Chambrone et al.. Se evaluaron los siguientes aspectos del estudio: 1) selección de grupos de estudio teniendo en cuenta el cálculo del tamaño de la muestra, representatividad de pacientes con periodontitis y su selección, descripción de los métodos utilizados para evaluar las condiciones periodontales, capacitación o calibración de los evaluadores de resultados, recopilación prospectiva de datos / uso de inclusión / exclusión clara criterios); 2) comparabilidad; 3) resultado y evaluación de los resultados microbiológicos; 4) criterios aplicados para evaluar las condiciones microbiológicas y adecuación del seguimiento del paciente; y 5) análisis estadístico. Se dieron puntos para cada criterio de calidad metodológica, y cada estudio incluido podría recibir un máximo de 14 puntos. Los estudios con 11 a 14 puntos se consideraron arbitrariamente de alta calidad, los estudios con ocho a 10 puntos fueron de calidad media y los estudios con <8 puntos fueron de baja calidad metodológica.

5.6 Análisis estadístico

Los datos se agruparon en tablas de evidencia y se creó un resumen descriptivo para determinar la cantidad de datos y las variaciones del estudio.

6. RESULTADOS

6.1 Resultados de la búsqueda

La figura 1 describe el flujograma de los artículos seleccionados a través del proceso de revisión.

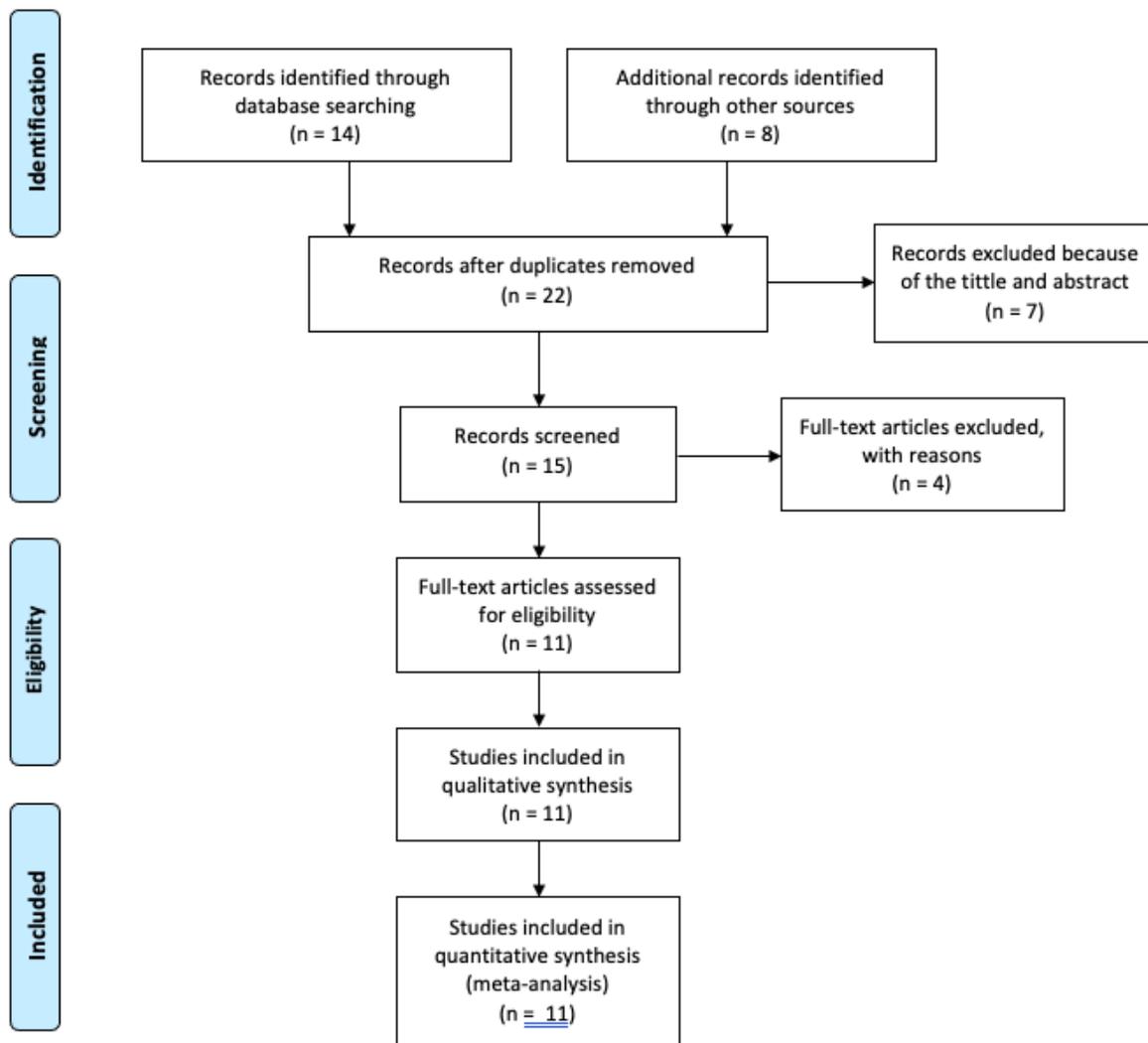


Figura 1 Diagrama de flujo de los artículos analizados durante el proceso de revisión

6.2 Resultados de la búsqueda y descripción de los estudios incluidos

El diagrama de flujo de los manuscritos filtrados a través del proceso de revisión se muestra en la Fig. 1. Los estudios que se incluyeron en esta revisión fueron estudios tipo cohorte - casos y control que estudiaron el microbioma subgingival en pacientes con periodontitis y

pacientes periodontalmente sanos, y que caracterizaron el microbioma por 16S y metagenómica. Encontrados en búsquedas de las base de dato EMBASE, hasta el 31 de agosto de 2020, independientemente de la edad o el sexo de los pacientes.

La estrategia de búsqueda electrónica arrojó 22 artículos, de los cuales se excluyeron 7 artículos tras la revisión del título y / o del resumen. 15 elementos fueron examinados en el texto completo para su evaluación, pero sólo 11 cumplieron los criterios de inclusión propuestos para su revisión.

Las características de los estudios se describen en la Tabla 2. Los estudios se han publicado en su totalidad. Los estudios incluidos han seguido durante un período ≥ 6 meses, se describe la inclusión / exclusión y similares que estudiaron el microbioma subgingival en pacientes con periodontitis y pacientes periodontalmente sanos, y que caracterizaron el microbioma por 16S y metagenómica. (Tabla 2).

Tabla 3. Características de los estudios incluidos.

Autor	Año	Grupos	Tamaño muestra	Técnica de secuenciación	Microorganismos
Schulz et al.	2019	<ul style="list-style-type: none"> • 26 sujetos grupo control de 13 pacientes periodontalmente sanos • Grupo experimental de 13 pacientes con periodontitis agresiva generalizada 	26 sujetos sin relación de origen caucásico de Alemania Central.	Genes de rRNA 16S se amplificaron, tomando la región V3/V4 y mediante el uso de la plataforma MiSeq	<p>Se encontraron 1713 especies bacterianas diferentes.</p> <p>No se encontraron diferencias significativas en la diversidad alfa entre los dos grupos de estudio.</p> <p>Se evaluaron las diferencias específicas de la enfermedad en la diversidad beta de la composición del microbioma. <i>Bacteroidetes</i>, <i>Spirochaetes</i> y <i>Synergistetes</i> fueron más abundantes en periodontitis agresiva generalizada, mientras que <i>Proteobacteria</i>, Firmicutes y Actinobacteria se asociaron con un periodonto sano. A nivel de especies bacterianas, mostraron que <i>Porphyromonas gingivalis</i> es el indicador más fuerte de abundantes en periodontitis agresiva generalizada. <i>Treponema denticola</i> y "complejo rojo" <i>Tanerella forsythia</i>, así como <i>Filifactor alocis</i>, se encontraban entre los diez principales biomarcadores de abundantes en periodontitis agresiva generalizada.</p>

<p>Griffen et al.</p>	<p>2012</p>	<p>Compara las comunidades bacterianas subgingivales de 29 controles periodontalmente sanos y 29 sujetos con periodontitis crónica.</p>	<p>58 sujetos participaron en el estudio</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mediante la secuenciación de 454 genes de ARNr 16S para comparar comunidades bacterianas subgingivales • Amplicones de las regiones V1-2 y V4 del gen 16S se secuenciaron, produciendo 1 393 579 secuencias. 	<p>Las <i>spiroquetas</i>, <i>synergistetes</i> y <i>bacteroidetes</i> fueron más abundantes en la enfermedad, mientras que las proteobacterias se encontraron en niveles más altos en controles sanos. Dentro del filo <i>Firmicutes</i> y la clase <i>Bacilli</i> se asoció con la salud, mientras que <i>Clostridia</i>, <i>Negativicutes</i> y <i>Erysipelotrichia</i> se asociaron con la enfermedad..</p>
<p>Abusleme et al.</p>	<p>2013</p>	<p>22 sujetos con periodontitis crónica y 10 sujetos periodontalmente saludables Los sujetos fueron reclutados de la clínica dental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile bajo un protocolo aprobado. Todos los sujetos eran no fumadores</p>	<p>32 sujetos participaron en el estudio</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se aisló ADN y se secuenciaron bibliotecas de amplicones de las regiones hipervariables V1-V2 del gen ARNr 16S utilizando tecnología de pirosecuenciación de titanio 454 • PCR cuantitativa para caracterizar el microbioma subgingival 	<p>Las comunidades de periodontitis tenían proporciones más altas de <i>espiroquetas</i>, <i>sinergistetes</i>, <i>firmicutes</i> y <i>cloroflexi</i>, entre otros taxones, mientras que las proporciones de actinobacterias, particularmente <i>Actinomyces</i>, eran más altas en salud. La carga total de <i>Actinomyces</i>, sin embargo, se mantuvo constante desde la salud hasta la periodontitis.</p>

<p>Park et al.</p>	<p>2015</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 12 sujetos periodontalmente sanos • 10 sujetos con gingivitis • 10 sujetos con periodontitis crónica • Pacientes con periodontitis agresiva fueron excluidos. • 	<p>Se seleccionaron 32 sujetos no fumadores, de 17 a 81 años, sin enfermedades sistémicas diagnosticadas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de ADN genómico, amplificación de genes de ARNr 16S, secuenciación de códigos de barras y asignación taxonómica de lecturas de secuenciación individuales • Para confirmar, se realizó una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 	<p><i>Bacteroidetes, Fusobacteria, Synergistetes y Spirochaetes</i> fueron los filos abundantes en sujetos con periodontitis, mientras que Firmicutes y Proteobacteria fueron identificados como los filos dominantes en sujetos con gingivitis y sanos, respectivamente. Aunque se observaron niveles altos de los géneros <i>Porphyromonas, Fusobacterium, Fretibacterium, Rothia, Filifactor y Treponema</i> en los sujetos con periodontitis, los géneros <i>Streptococcus, Capnocytophaga, Leptotrichia</i> y <i>Haemophilus</i> se encontraron con alta frecuencia en los sujetos con gingivitis. Las especies que incluyen <i>Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum y Fretibacterium fastidiosum</i> aumentaron significativamente en sujetos con periodontitis. Por otro lado, <i>Streptococcus pseudopneumoniae, Haemophilus parainfluenzae</i> y <i>Leptotrichia hongkongensis</i> se observaron preferentemente en los sujetos con gingivitis.</p>
<p>Jorth et al.</p>	<p>2014</p>	<p>30 muestras relacionadas a un periodonto sano y 30 muestras relacionadas a periodontitis</p>	<p>10 sujetos participaron en el estudio</p>	<p>Secuenciación de genes de rRNA 16S</p>	<p>Los microorganismos en enfermedad fueron aquellos previamente asociados con la infección, incluyendo <i>Tannerella sp., Prevotella sp., Treponema sp. y Porphyromonas sp</i></p>

López et al.	2020	Este estudio incluyó 10 sitios periodontalmente sanos y 12 sitios con periodontitis crónica.	Se analizaron 22 sitios, periodontalmente sanos y con periodontitis de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada	Se recolectaron y analizaron muestras de biopelícula subgingival mediante pirosecuenciación masiva 16S.	Por phyla, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Spirochaetes y Synergistete estaban altamente asociados con la enfermedad periodontal. Por otro lado, Actinobacteria se encontró en mayor proporción en salud. Por clases, Bacteroidia, Clostridia, Flavobacteriia y Fusobacteriia se encontraron en mayor proporción en la enfermedad periodontal, mientras que Gammaproteobacteria fue más abundante en la salud. Por géneros, <i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Tannerella</i> y <i>Treponema</i> se detectaron con mayor frecuencia en enfermedad y <i>Actinomyces</i> y <i>Rothia</i> se detectaron con mayor frecuencia en salud
Dabdoub et al.	2016	The present study 25 sujetos con periodontitis crónica generalizada y 25 sujetos periodontalmente sanos	50 sujetos participaron en el estudio	Secuenciación de genes de rRNA 16S	<ul style="list-style-type: none"> • Niveles más altos de varias especies, en particular las pertenecientes a los géneros <i>Porphyromonas</i>, <i>Fusobacterium</i>, <i>Fretibacterium</i>, <i>Filifactor</i>, <i>Parvimonas</i>, <i>Selenomonas</i>, <i>Treponema</i> y <i>Kingella</i> • En los sitios sanos predominaron grampositivos, especialmente los pertenecientes a los géneros <i>Streptococcus</i>, <i>Enterococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>, mientras que en las enfermedades gramnegativas asociadas a <i>Prevotella</i>, <i>Burkholderia</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Haemophilus</i> y <i>Aggregatibacter</i> fueron significativamente más abundantes.

					<ul style="list-style-type: none"> Las abundancias de las especies de arqueobacterias <i>Methanobrevibacter oralis</i>, <i>M. smithii</i>, <i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> y <i>Methanosphaera stadtmaniae</i> fueron significativamente más altas en la enfermedad en comparación con la salud.
Tsai et al.	2018	10 sujetos periodontalmente sanos y 10 sujetos con periodontitis crónica severa fueron analizados	Composicion de la microbiota subgingival en salud y en periodontitis, se analizaron un total de 20 muestras	Se comparó utilizando de objetivo el ARNr 16S metagenómico y una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).	<p><i>Streptococcus</i> dominó en todas las muestras sanas, mientras que <i>Prevotella</i>, <i>Porphyromonas</i> y <i>Treponema</i> fueron muy abundantes en todas las muestras de periodontitis. Solo ocho géneros, incluidos <i>Lautropia</i>, <i>Parvimonas</i>, <i>Actinomyces</i>, <i>Capnocytophaga</i>, <i>Paludibacter</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Haemophilus</i> y <i>Corynebacterium</i>, fueron significativamente altos en el grupo sano.</p> <p>Y seis géneros, incluidos <i>Porphyromonas</i>, <i>Treponema</i>, <i>Tannerella</i>, <i>Aggregatibacter</i>, <i>Peptostreptococcus</i>, fueron significativamente altos en el grupo de periodontitis</p>

6.3 Estudios incluidos

Se incluyeron 11 estudios tipo cohorte - casos y control para nuestra revisión sistemática: Schulz et al. (2019), Griffen et al. (2012), Abusleme et al. (2013), Park et al. (2015), Jorth et al. (2014), López et al. (2020), Dabdoub et al. (2016), Tsai et al. (2018). La edad de los participantes en los estudios incluidos se presentó en un valor ≥ 1 año.

7. DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la etiología de la periodontitis ha cambiado conforme avanzan los años. La interacción entre un microbioma oral disbiótico y la respuesta inmune del huésped se ha convertido en el centro de interés. Diversos estudios clínicos basados metódicamente en la secuenciación o pirosecuenciación de nueva generación, evaluaron la composición y variabilidad del microbioma en pacientes que presentaban enfermedad periodontal crónica

Para identificar la abundancia y diversidad de bacterias en una muestra, los cebadores utilizados para la amplificación se dirigen a regiones conservadas del genoma bacteriano ARNr 16S y abarcan regiones hipervariables (V) (que van desde V1 a V9).(Schulz et al 2019)

Se ha identificado una mayor diversidad de bacterias en muestras enfermas en comparación con muestras sanas. (Tsai et al. 2016)

Los phylum predominantes en la enfermedad fueron *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Synergistetes*, *Spirochaete*, sin embargo Abusleme et al. y Lopez et al. en sus estudios indicaron abundante presencia de *Firmicutes*

La gran mayoría de los estudios señalan a la especie *Porphyromonas gingivalis* como el patógeno clave de la enfermedad periodontal, en conjunto con *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, sin embargo Griffen et al. menciona a *Filifactor alocis* como otro microorganismo que parece estar fuertemente asociado a la enfermedad y es igual de prevalente. (Schulz et al 2019)(Griffen et al. 2012). De acuerdo con las características de *F. alocis*, como resistencia al estrés oxidativo, la participación en vías metabólicas de los aminoácidos y la influencia sobre el proteoma del huésped, se le indica con un alto potencial de virulencia y progresión en la enfermedad periodontal. (Schulz et al 2019). La presencia de especies como *F.nucleatum*, *F. fastidiosum*, *P. intermedia*, *P. endodontalis* y varias otras no cultivables definitivamente merecen más atención (Schulz et al 2019)(Griffen et al. 2012) (Park et al 2015) (Tsai et al. 2016)

El reporte de Abusleme et al. muestra que el phylum Actinobacteria está fuertemente asociadas con la salud y que esto podría explicarse por una mayor detección de *Actinomyces* y *Rothia*, posiblemente debido al uso de curetas como método de muestreo, lo que se supone incluye a los colonizadores iniciales presentes en la masa de la biopelícula adherida a la superficie de la raíz. Mientras que los estudios Griffen et al. 2012 y Park et al 2015 que recolectaron las muestras mediante puntas de papel, arrojando como hallazgos la abundante presencia de Proteobacterias y Firmicutes en pacientes sanos, Schulz et al. también reporta la presencia de estos phylum en salud.

Abusleme et al. encontró OTUs de Streptococcus como Streptococcus sanguinis que aumentaron en salud, mientras que *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus sp. (OT 071)* se asociaron con la enfermedad, así también el *Treponema spp.*, el *TM7 spp* y uno perteneciente al phylum *Chloroflexi*.

Los géneros *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Leptotrichia* tienen una aparente asociación con la gingivitis, entre ellos, se sabe que *Streptococcus* está involucrado en el inicio de la formación de placa. Por lo tanto, la acumulación y la unión de Streptococcus en la superficie del diente proporcionan una mayor coagregación y coadherencia de las bacterias orales al producir polisacáridos. (Park et al 2015)

Dabdoub et al. 2016 observó niveles más altos de varias especies pertenecientes a los géneros *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Fretibacterium*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Selenomonas*, *Treponema*, *Kingella*, *Prevotella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Haemophilus* y *Aggregatibacter*, y en sitios sanos predominan los pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*.

La abundancia de especies de arqueobacterias como *Methanobrevibacter oralis*, *M. smithii*, *Methanomassiliicoccus luminyensis* y *Methanosphaera stadtmaniae* fueron significativamente mayores en la enfermedad.

Además expresa que el marco genómico está configurado para la obtención de energía principalmente a través del metabolismo de carbohidratos, y está mediada principalmente por la fosforilación oxidativa; los altos niveles de aminotransferasas y

la vía del glutamato apuntan al ciclo del ácido cítrico como un mecanismo de transferencia de energía preponderante, lo que posiblemente se ve facilitado por las altas tensiones de oxígeno que prevalecen en el surco gingival sano. Por otro parte, en la periodontitis, la fermentación y la metanogénesis son las vías predominantes para la adquisición de energía. (Dabdoub et al. 2016).

La presencia de arqueobacterias, la escasez de genes reductores de sulfato y las correlaciones entre la abundancia de genes de fermentación bacteriana y genes de metanogénesis sugieren una transferencia de hidrógeno entre especies sintróficas entre arqueobacterias y eubacterias en la enfermedad periodontal, lo que corrobora que la presencia de arqueobacterias puede promover la colonización por microorganismos fermentadores. (Dabdoub et al. 2016).

La fermentación de un mol de glucosa produce 2 a 4 moléculas de ATP en comparación con la respiración aeróbica, que produce 32 a 36 ATP. Además, los productos finales de la fermentación, los ácidos grasos de cadena corta como el butirato, el propionato y el isobutirato, por ejemplo, se han asociado fuertemente con la periodontitis. Por lo tanto, se sugiere que el microbioma asociado a la enfermedad carece de la capacidad para el procesamiento eficiente de la energía, lo que obliga a esta comunidad a realizar un 'trabajo duro y especializado' en lugar de un 'trabajo inteligente' para sobrevivir, y que los subproductos así creados contribuyen a la etiología de la enfermedad. (Dabdoub et al. 2016).

Por tanto, la enfermedad está dominada por 'organismos especializados', que codifican funciones metabólicas nuevas (proteólisis, fermentación, metanogénesis) o factores de virulencia (motilidad, comunicación, respuesta al estrés, adquisición de hierro, resistencia a los antibióticos) no observados en salud. (Dabdoub et al. 2016).

Como se ha logrado ver en los diferentes estudios los microorganismos del complejo rojo se mantienen en su identificación para periodontitis en donde como muy bien sabemos la *P. gingivalis* es un patógeno clave que provoca una disfunción de las respuestas inflamatoria e inmunitaria, mediante factores de virulencia como

lipopolisacáridos (LPS), fimbrias, lipoproteínas y proteinasas, incluidas las gingipaínas, lo que genera comunidades microbianas orales disbióticas. Las arg-gingipaínas (RgpA y RgpB) y la lis-gingipaína (Kgp) son responsables de la mayor parte de la actividad proteolítica bacteriana y tiene un papel importante en el sinergismo patológico con *T. forsythia*. Además su coagregación genera el aumento de IL-6 lo que se traduce en una activación de osteoclastos que actúan en la destrucción del hueso alveolar.

También podemos ver nuevamente como estos periodontopatógenos del complejo rojo *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* permiten una coinfección que induce la producción de quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), prostaglandina E2 y MMP-9.(Tamai et al. 2008)(Suzuki et al. 2013)

Por otra parte la *T. forsythia* posee algunos factores de virulencia, como la proteasa similar a tripsina, la sialidasa, hemaglutinina, componentes de la capa S bacteriana y una proteína secretada y asociada a la superficie celular (BspA), lo que le permite invadir células epiteliales y evade respuestas inmunitarias del huésped y le funciona como reservorio importante en infecciones recurrentes.(Mohanty et al. 2019) (Suzuki et al. 2013)

Cabe resaltar que *T. denticola* y *P. gingivalis* tienen varias características que los hacen como principales periodontopatógenos ya que ocurren concomitantemente con los signos clínicos de destrucción periodontal. Y aparecen estrechamente vinculados topológicamente en la biopelícula en desarrollo. *T. denticola* se encuentra dentro de las capas superficiales de la placa subgingival, mientras que *P. gingivalis* se observa predominantemente debajo de esta capa, que mediante la dentilisina, una proteasa similar a la quimotripsina de *T. denticola*, le permite la unión a las fimbrias de *P. gingivalis*.(Mohanty et al. 2019)(Tamai et al. 2008)

Además producen factores estimulantes del crecimiento de la microbiota como ácido isobutírico y ácido succínico. También la *F. nucleatum* aumentó la expresión de genes de producción de butirato durante la enfermedad. Se han medido niveles elevados de butirato en bolsas periodontales enfermas, y los estudios en cultivo celular han

demostrado que estas concentraciones de butirato pueden detener el crecimiento celular humano, retrasando potencialmente el proceso de cicatrización.(Jorth et al 2014)

7.1. Microbiota de la biopelícula subgingival en periodontitis y periodonto sano

El microbioma oral contiene un gran número de especies no cultivables, otra gran parte de las secuencias podrían identificarse en un 98% como especies cultivables; este número de especies osciló entre 100 y 300 en un solo individuo, y se detectaron un total de 692 especies en total. Este noventa y ocho por ciento se ha categorizado en seis filos principales que incluyen Firmicutes, Actinobacterias, Bacteroidetes, Proteobacteria, Spirochaetes y Fusobacteria, mientras que el 2% restante de taxones pertenecen a phyla Euryarchaeota, Chlamydia, Chloroflexi y Synergistetes. Algo a tener en cuenta son los firmicutes ya que contribuyen a la mayor parte de bacterias de un paciente periodontalmente sano.

Los miembros de Actinobacteria comparten el mismo nicho con otros microorganismos orales estos son taxones Gram(+) rico en G + C donde se han detectado Actinomyces, Rothia y Mycobacterium. Las fusobacterias pertenecen a los colonizadores tardíos de la cavidad bucal sana donde se encontraron Fusobacteriaceae y Leptotrichiaceae; Fusobacterium nucleatum es una bacteria proinflamatoria de la cavidad oral bien estudiada y se utiliza a menudo para estudiar la interacción microbiana entre los bacilos grampositivos. También se ha documentado la presencia de espiroquetas Gram(-) en pacientes periodontalmente sanos donde podemos encontrar Leptospiraceae y Spirillaceae. Sin embargo, Griffen et al. (2011) clasificaron las espiroquetas en una microflora asociada a la salud junto con Synergistetes y Bacteroidetes.

Schulz et al 2009, Griffen et al. 2012, Abusleme et al 2013 coinciden en sus estudios sobre la presencia de los phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria en salud periodontal, Abusleme et al 2013, Lopez et al. 2020, refieren el predominio del genero

actinomices en salud periodontal. Dabdoub et al 2016 refiere la presencia *Streptococcus, Enterococcus and Lactobacillus* (gram +).

Schulz et al 2009, Griffen et al. 2012, Abusleme et al 2013, Park et al 2015, Lopez et al. 2020 , coinciden en sus estudios sobre la presencia de los phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Spirochaetes and Synergistete en pacientes con enfermedad periodontal

Schulz et al 2009, , Park et al 2015, Jorth et al 2014, Lopez et al. 2020 describen la abundante presencia de Especies: *Porphyromonas gingivalis Treponema denticola y Tanerella forsythia, Filifactor, prevotella, Fusobacterium*; Park et al 2015 obtuvo resultados con presencia de géneros como *Fretibacterium, Rothia*, mientras que , Lopez et al. 2020 demostró la abundante presencia de *Leptotrichia*.

Por esto mismo la prevalencia de los principales phyla y microorganismos periodontopáticos en pacientes con periodonto sano nos son similares entre sí. Lo cual nos permite diferenciar entre estos microbiomas y así permitir un diagnóstico más acertado.

La secuenciación genómica no solo permitió corroborar el papel que juega el complejo rojo en la enfermedad periodontal, sino que también arrojó la presencia de nuevos microorganismos no cultivables como *Filifactor alocis, Centipeda género, Mitsuokella sp., Selenomonas Género, Actinobacter baumannii* que de cierta forma tienen un rol en el proceso disbiótico de la periodontitis. Aunque se ha demostrado que el origen étnico influye en las comunidades bacterianas debido a las diferencias en la dieta, la genética y el estilo de vida. (Park et al 2015)

8. CONCLUSIONES

La periodontitis es una infección heterogénea caracterizada por mayor diversidad de Phylums y la presencia de microorganismos del complejo rojo principalmente *Porphyromonas gingivalis* que juega un papel clave.

Sin embargo, las técnicas de secuenciación han permitido identificar otros microorganismos no cultivables asociados a la periodontitis, como lo son *Filifactor*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus sp. (OT 071)* que se asociaron con la enfermedad, así también el *Treponema spp.*, el *TM7 spp*, *Mitsuokella* y *Fretibacterium*.

La supervivencia de estos microorganismos en ambientes de mucha tensión dentro de la bolsa periodontal se debe a la codificación de nuevas funciones metabólicas como la proteólisis, fermentación, metanogénesis; o factores de virulencia como la motilidad, comunicación, respuesta al estrés, obtención de hierro y resistencia a los antibióticos lo que genera subproductos que contribuyen a la etiología de la enfermedad.

9. PROPIEDAD INTELECTUAL

9.1 Derechos de Autor

Las denominadas redes digitales, fruto de la combinación de la informática y las telecomunicaciones, no sólo son una novedosa herramienta para la transmisión de datos e información, sino que marcaron el inicio de una nueva sociedad, la denominada sociedad de la información, lo que está causando alteraciones en las relaciones económicas, políticas, sociales y culturales, y está incidiendo definitivamente en el desarrollo de las naciones: “estas superautopistas de la información -o más exactamente, redes de inteligencia distribuida- permitirán compartir la información, conectar y comunicar a la comunidad global...la Infraestructura Global de la Información es el prerequisite esencial para el desarrollo sostenido”.

La tecnología digital que permite la transmisión de información a costos más bajos y de manera más veloz, comparados con los medios tradicionales, hace posible la comunicación interactiva entre millones de usuarios conectados a la red. En razón a que gran parte de la información que circula a través de las redes digitales, está constituida por obras protegidas por el derecho de autor, la comunidad internacional ha volcado su atención sobre las adecuaciones que debe emprender el derecho de autor, de manera que sea el sistema apto para responder a los desafíos que las tecnologías de la comunicación y la información le han planteado, con el fin de garantizar la libre circulación de bienes culturales, su divulgación y acceso, y a la vez, asegurar a los autores y demás titulares de derechos una protección adecuada a sus obras y a las inversiones en su producción.

Se hace imperativa una respuesta legislativa, acorde con el marco internacional que al efecto ha establecido el Tratado de la Organización Mundial de la Propiedad intelectual “OMPI” de 1996 sobre Derecho de Autor -TODA- para la adecuada protección de las obras en el entorno digital.

9.2 Implicaciones para el derecho de autor de nuevas creaciones y de nuevos derechos

Todos estos avances de la tecnología digital tienen sus implicaciones para el derecho de autor, que aún no se acaban de conocer con certeza, en razón a la dinámica misma de la tecnología. El libro es quizás uno de los sectores más afectados por las nuevas tecnologías y que ha traído mayores repercusiones para el derecho de autor, en razón a que otros sectores ya habían experimentado y solucionado los problemas derivados de su divulgación a través de soportes intangibles, mientras que el libro todavía no lo ha hecho.

Existen los sistemas anticopia, que justamente impiden copiar una obra; los sistemas de acceso, para garantizar la seguridad y adecuado acceso a la información y a los contenidos protegidos, como la criptografía, la firma digital, el sobre electrónico; los sistemas de marcado y tatuaje, en los que se inscribe cierta información en un código digital, como la marca de agua.

En relación con este tema, la normativa internacional a través de los Tratados Internet ha establecido la obligación para los Estados miembros de proporcionar protección jurídica adecuada y recursos jurídicos efectivos contra la acción de eludir las medidas tecnológicas efectivas que sean utilizadas por los autores en relación con el ejercicio de sus derechos en virtud del presente Tratado o del Convenio de Berna y que, respecto de sus obras, restrinjan actos que no estén autorizados por los autores concernidos o permitidos por la Ley.

En este propósito de garantizar una efectiva protección de las obras en el entorno digital, la gestión colectiva de derechos de autor adecuada a este mundo digital podrá, mediante la aplicación de dispositivos de identificación y rastreo de obras, controlar su uso de las obras a través de las transmisiones digitales.

El derecho de autor, como derecho de propiedad sui generis, tiene una función social que se ha expresado a través de los casos en que se restringe su ejercicio exclusivo, en aras de alcanzar propósitos de orden educativo, cultural y de información.

Los casos de libre utilización pretenden crear un equilibrio entre el derecho de autor y el derecho a la cultura, a la educación, a la información, los cuales deben enmarcarse dentro de parámetros internacionales, conocidos como usos honrados, en razón a que

su uso masivo a nivel universal causaría graves perjuicios a la producción y comercialización de bienes intelectuales. Estos casos de libre utilización deben ser expresamente establecidos en la ley y son de interpretación restrictiva.

Esto significa que la libre utilización de obras en el entorno digital con fines de enseñanza y las establecidas para las bibliotecas deberán revisarse para establecer si deben ser ampliadas en el entorno digital o no, para adecuarse a los parámetros internacionales señalados por el TODA en su artículo 10, según los cuales debe tratarse de casos especiales, que no atenten contra la normal explotación de la obra y no causen un perjuicio injustificado a los intereses del autor. En qué casos la digitalización, el almacenamiento o la transmisión digital de fondos bibliográficos, o de material educativo, está permitida y en qué casos no lo está.

Desde las técnicas analógicas ya se anotaba que no se justificaba más como caso de restricción al derecho exclusivo del autor. Evidentemente las técnicas digitales agravan la situación puesto que, como lo afirma André Lucas se aumenta la oferta y mejora la calidad hasta tal punto que es de temer que, gracias a la difusión de las técnicas digitales, al autor no le quede ya nada que explotar, agregamos: si no se controla su explotación a través de los mismos medios tecnológicos que pueden permitir un seguimiento riguroso de la explotación de obras. Mantener la copia privada como libre reproducción no tiene justificación alguna en el ámbito digital, donde tendría un impacto mucho más negativo para la economía, en razón a que su difusión sería muy superior.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., ... Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*, 7(5), 1016–1025.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
2. Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B. Y., & Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontology 2000*, 86(1), 57–78.
<https://doi.org/10.1111/prd.12362>
3. Ai, D., Huang, R., Wen, J., Li, C., Zhu, J., & Xia, L. C. (2017). Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC Genomics*, 18(Suppl 1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3254-5>
4. Batista, D., Carvalho, A. P., Costa, R., Coutinho, R., Dobretsov, S., Verstraete, W., ... Sherr, E. B. (2002). Comparative integrated omics: identification of key functionalities in microbial community-wide metabolic networks. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 57(6), 10–13. <https://doi.org/10.1038/npjbio>
5. Boutin, S., Hagenfeld, D., Zimmermann, H., El Sayed, N., Höpker, T., Greiser, H. K., ... Dalpke, A. H. (2017). Clustering of subgingival microbiota reveals microbial disease ecotypes associated with clinical stages of periodontitis in a cross-sectional study. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00340>
6. Cao, Y., Qiao, M., Tian, Z., Yu, Y., Xu, B., Lao, W., ... Li, W. (2018). Comparative Analyses of Subgingival Microbiome in Chronic Periodontitis Patients with and Without IgA Nephropathy by High Throughput 16S rRNA Sequencing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(2), 774–783.
<https://doi.org/10.1159/000490029>

7. Chen, H., Liu, Y., Zhang, M., Wang, G., Qi, Z., Bridgewater, L., ... Pang, X. (2015). A Filifactor alocis-centered co-occurrence group associates with periodontitis across different oral habitats. *Scientific Reports*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep09053>
8. Chowdhury, S., & Chakraborty, P. pratim. (2017). Universal health coverage - There is more to it than meets the eye. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 6(2), 169–170. <https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe>
9. Cui, X., Liu, J., Xiao, W., Chu, Y., & Ouyang, X. (2019). Subgingival microbiome in Chinese patients with generalized aggressive periodontitis compared to healthy controls. *Archives of Oral Biology*, 101(February), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.02.012>
10. Dabdoub, S. M., Ganesan, S. M., & Kumar, P. S. (2016). Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis. *Scientific Reports*, 6(April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38993>
11. Dougados, M. (2014). Response to: Comorbidities in a mexican mestizo cohort with established rheumatoid arthritis by vega morales et al. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(3), 134–144. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204954>
12. Duran-Pinedo, A. E., Chen, T., Teles, R., Starr, J. R., Wang, X., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2014). Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME Journal*, 8(8), 1659–1672. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.23>
13. Fiorillo, L., Cervino, G., Laino, L., D'Amico, C., Mauceri, R., Tozum, T. F., ... Ciccì, M. (2019). Porphyromonas gingivalis, periodontal and systemic implications: A systematic review. *Dentistry Journal*, 7(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/dj7040114>

14. Griffen, A. L., Beall, C. J., Campbell, J. H., Firestone, N. D., Kumar, P. S., Yang, Z. K., ... Leys, E. J. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME Journal*, 6(6), 1176–1185. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.191>
15. Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
16. Horiuchi, A., Kokubu, E., Warita, T., & Ishihara, K. (2020). Synergistic biofilm formation by *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum*. *Anaerobe*, 62, 102100. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102100>
17. Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., & Whiteley, M. (2014). Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-14>
18. Kirst, M. E., Li, E. C., Alfant, B., Chi, Y. Y., Walker, C., Magnusson, I., & Wanga, G. P. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 783–793. <https://doi.org/10.1128/AEM.02712-14>
19. Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*, 42(1), 47–79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x>
20. Kreth, J., Merritt, J., & Qi, F. (2009). Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA and Cell Biology*, 28(8), 397–403. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0868>

21. Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21(3), 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004>
22. Liu, B., Faller, L. L., Klitgord, N., Mazumdar, V., Ghodsi, M., Sommer, D. D., ... Amar, S. (2012). Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037919>
23. Liu, G., Chen, F., Cai, Y., Chen, Z., Luan, Q., & Yu, X. (2020). Measuring the subgingival microbiota in periodontitis patients: Comparison of the surface layer and the underlying layers. *Microbiology and Immunology*, 64(2), 99–112. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12759>
24. López-Martínez, J., Chueca, N., Padial-Molina, M., Fernandez-Caballero, J. A., García, F., O'valle, F., & Galindo-Moreno, P. (2020). Bacteria associated with periodontal disease are also increased in health. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 25(6), e745–e751. <https://doi.org/10.4317/medoral.23766>
25. Lourenço, T. G. B., Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Colombo, A. P. V. (2014). Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(11), 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>
26. Mariano Sanz, M. T. (2019). Periodontitis. Orientación para clínicos. *Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración*, 2019, 12.
27. Mark Bartold, P., & Van Dyke, T. E. (2017). Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontology 2000*, 75(1), 317–329. <https://doi.org/10.1111/prd.12169>

28. Moon, J. H., Lee, J. H., & Lee, J. Y. (2015). Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. *Molecular Oral Microbiology*, *30*(3), 227–241. <https://doi.org/10.1111/omi.12086>
29. Park, O. J., Yi, H., Jeon, J. H., Kang, S. S., Koo, K. T., Kum, K. Y., ... Han, S. H. (2015). Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *Journal of Dental Research*, *94*(7), 921–927. <https://doi.org/10.1177/0022034515583531>
30. Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2012). Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe*, *18*(6), 576–580. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.10.001>
31. Schulz, S., Porsch, M., Grosse, I., Hoffmann, K., Schaller, H. G., & Reichert, S. (2019). Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects. *Archives of Oral Biology*, *99*(January 2019), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.015>
32. SEPA. European, Of, F., & Periodontology. (2019). Salud periodontal y gingivitis. *Guías Clínicas EPA/SEPA, 2019*, 12. Retrieved from https://www.sepa.es/web_update/wp-content/uploads/2019/08/01_PeriodontalHealth_Gingivitis_Castellano.pdf
33. Signat, B., Roques, C., Poulet, P., & Duffaut, D. (2011). Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*, *13*(2), 25–36.
34. Solbiati, J., & Frias-Lopez, J. (2018). Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *Journal of Dental Research*, *97*(5), 492–500. <https://doi.org/10.1177/0022034518761644>

35. Suzuki, N., Yoneda, M., & Hirofuji, T. (2013). Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *International Journal of Dentistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/587279>
36. Tamai, R., Deng, X., & Kiyoura, Y. (2009). Porphyromonas gingivalis with either Tannerella forsythia or Treponema denticola induces synergistic IL-6 production by murine macrophage-like J774.1 cells. *Anaerobe*, 15(3), 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.12.004>
37. Tanner, A. C. R., & Izard, J. (2006). Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontology 2000*, 42(1), 88–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00184.x>
38. Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., & Haffajee, A. (2013). Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, 62(1), 95–162. <https://doi.org/10.1111/prd.12010>
39. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89(February), S159–S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
40. Tsai, C. Y., Tang, C. Y., Tan, T. S., Chen, K. H., Liao, K. H., & Liou, M. L. (2018). Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(2), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.04.007>
41. Vieira Colombo, A. P., Magalhães, C. B., Hartenbach, F. A. R. R., Martins do Souto, R., & Maciel da Silva-Boghossian, C. (2015). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial Pathogenesis*, 94, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.009>

42. Wager, M. G. T. and J. F. S. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00332.x>. Virulence
43. Wang, J., Qi, J., Zhao, H., He, S., Zhang, Y., Wei, S., & Zhao, F. (2013). Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep01843>
44. Yu, X. L., Chan, Y., Zhuang, L., Lai, H. C., Lang, N. P., Keung Leung, W., & Watt, R. M. (2019). Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease. *Clinical Oral Implants Research*, 30(8), 760–776. <https://doi.org/10.1111/clr.13459>