

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del Microbioma Subgingival en Pacientes
con Periodontitis en España y Colombia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Roquelina del Rosario Pianeta Alviz

Directores

**Prof. Dr. D. David Herrera González
Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso
Profa. Dra. Dña. Gloria Inés Lafaurie Villamil**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del Microbioma Subgingival en Pacientes
con Periodontitis en España y Colombia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Roquelina del Rosario Pianeta Alviz

Directores

**Prof. Dr. D. David Herrera González
Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso
Profa. Dra. Dña. Gloria Inés Lafaurie Villamil**

Madrid, diciembre 2021



Caracterización del Microbioma Subgingival en Pacientes con Periodontitis en España y Colombia

Roquelina del Rosario Pianeta Alviz

TESIS DOCTORAL

Directores

Prof. Dr. D. David Herrera González
Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso
Prof. Dr. Dña. Gloria Inés Lafaurie Villamil

Madrid, diciembre 2021



Esta tesis Doctoral ha sido posible gracias a **MINCIENCIAS**, Colombia (Número Grant 130880763942), y a la **Cátedra Extraordinaria Dentaid de Investigación en Periodoncia**, Universidad Complutense de Madrid, España.

A mis padres, Moisés (q.e.p.d.) y Maru.

A Gon.

¡Lo logramos!

“Hacia la conquista de un hombre mejor”

Dr. Moisés Pianeta Muñoz

AGRADECIMIENTOS

Aquí estoy, ocho años después desde el primer día en que pisé la Universidad Complutense de Madrid para hacer el máster, y después el doctorado. Tantas experiencias que intentaré resumir en este corto espacio. Antes de empezar a escribir, he cerrado los ojos y he recordado, como si de una película se tratara, cada uno de los momentos vividos y a las personas que los han compartido conmigo.

Al primero que veo es a ti, **David**, y en lo que pienso es, en maestro, en hermano mayor, en guía, en perfección, en exigencia. Fue intenso, pero lograste que conociera mis capacidades, y mis límites, y que incluso mejorara mi manera de buscar soluciones a los problemas de la vida. Hasta aquí tú me has traído. Luego lo veo a usted, **Dr. Sanz**, y pienso en su consejo de: “Nina, mejor ser cabeza de ratón y no cola de león”. Sus sabias palabras, me han permitido esperar con paciencia los designios de la vida. Ha sido un honor para mí ser su alumna. Y me huele a café. Si, es usted, **Dra. Iniesta**, con su paciencia infinita al tomarse el tiempo de enseñarme a rehacer tablas eternas. Estuvo ahí para sufrir y gozar nuestra primera publicación, y aquí se queda como muestra de todo eso en una imagen. En el laboratorio veo a **Arancha** y a **María**, a quienes echo de menos y debo mucho de lo que soy. Y ahí mismo está **Ana** con su espíritu de enseñanza, e **Itziar** que, aunque ya estaba jubilada, iba al laboratorio, para seguir enseñándome a reconocer los “fuso” y los “Aa”. **Mariajo**, dispuesta a hacer todo por sacar el trabajo adelante. Y **Leire**, con su dulzura, siempre apoyándolo todo. Prueba de ello quedará para siempre en esta tesis en tres fotos. Sé que cuando las veas, sabrás a lo que me refiero.

De repente, vuelvo a Colombia, y la veo a usted, **Dra. Lafaurie**. Por más obstáculos que aparecieron, nunca permitió que perdiera la constancia y la motivación por conseguir los objetivos. Es ejemplo de como se puede ser tan brillante y exitosa, y tan cercana y humana al mismo tiempo. A seguir trabajando juntas. Y en el laboratorio UIBO en Bogotá, veo a **Dianita**, a **Yor**, a **Naty** y a **Yineth**, quienes, con su generosidad, junto con la Dra. Lafaurie, nunca me abandonaron y no permitieron que el trabajo dejara de seguir su curso.

Aparecen mis compañeros de trabajo, **mi familia CURN**. Los que aguantaron mis ausencias, y que además siempre me dieron ánimo. Y la veo a usted **Dra. Patri**, con su apoyo incondicional, sin dudar ni un momento en darme el espacio suficiente para crecer, y para cumplir con mi propósito. Y me reflejo en **mis alumnos**. Ponerme en sus zapatos me ha enseñado a comprenderlos, y a exigirles según sus particularidades. Miro a **Alfre**, quien junto a **Victor**, son mis alcahuetas cuando se me ocurre emprender cualquier cosa. ¡Vamos, Ape, que tú también lo conseguirás! Te veo **Silie**, mi amiga querida, con tu confianza en mí, haciéndome sentir valorada. Sabes que una parte de todo esto, se lo debo a tu empeño por buscarme un sitio en la periodoncia en Colombia. Haremos realidad todos nuestros planes. Vuelvo a España y está usted, **Don Pedro**, que en ocasiones ha aplazado la celebración de su cumpleaños, con tal de esperar mi llegada, luego de que hiciera los talleres en Madrid. Qué alegría saber que me encontraría con su abrazo y con su cariño al volver a Bilbao. Y ahí está **mi familia vasca**, que también han estado en el proceso, y aquí están conmigo hasta el final. En España también estás tú, **Andrés**, el amigo que siento que lo será para siempre, el que nunca dice no, y al que siempre diré sí (en todo lo que se nos ocurra).

Aprieto aún más los ojos, y veo a mi padre, **Moisés** (q.e.p.d.). Mis pasos son los suyos, porque no me abandona nunca, guiándome el camino “hacia la conquista de un hombre mejor”. Y a su lado, veo a mi **Maru**, mi madre, quien ha luchado toda su vida por mí y para mí. Alegrándose de mis días felices y quitándole peso a los menos gratos. A ver si ya la libero de tantos sobresaltos. Y al final del camino te veo a ti, **Gon**. El único que junto a mí ha estado en ambos sitios. El que lo ha aguantado todo, y que se ha quedado o se ha ido a donde hubiese que ir, sin importarle aplazar sus propios intereses. El que dice todos los días, tú puedes, te dará tiempo, vas a lograrlo, ¿qué necesitas?, allá vamos, lo solucionaremos, y mucho más. El autor en las sombras, el corrector del inglés (hasta que te aburraste, jeeje), el camarógrafo en los talleres, el acompañante en los congresos y en los seminarios, en resumen, el ángel que me envió el cielo, TQRPLL.

Agradezco a Dios, y a mi compañera la Virgen María, por permitir que hagan parte de mi vida, y por haber aprendido de todos, y de muchos de ustedes, aún seguir aprendiendo.

¡MUCHAS GRACIAS!



1. Resumen.....	19
2. Introducción.....	31
1. DIAGNÓSTICO PERIODONTAL: <i>la era de los estadios y grados</i>	32
1.1. <i>El Punto de Partida</i>	32
1.2. <i>La Nueva Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias 2018</i>	33
1.3. <i>Salud Gingival Clínica</i>	35
1.4. <i>Gingivitis Inducida por Biofilm Dental</i>	37
1.5. <i>Periodontitis</i>	40
2. BASES DE DATOS EPIDEMIOLÓGICAS: <i>la evidencia clínica</i>	48
2.1. <i>El Mundo</i>	49
2.2. <i>España</i>	49
2.3. <i>Colombia</i>	51
3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MICROBIANOS <i>del cultivo bacteriano a las técnicas de secuenciación</i>	52
3.1. <i>La Importancia del cultivo bacteriano</i>	52
3.2. <i>Obtención de Datos Multidimensionales: el uso de las ómicas</i>	54
3.2.1. <i>Secuenciación del gen ARNr 16S</i>	54
3.2.2. <i>El gen ARNr 16S</i>	55
3.2.3. <i>Secuenciación del gen ARNr 16S con la metodología Illumina</i>	57
3.2.4. <i>Análisis de los datos de Secuenciación</i>	58
4. MARCADORES MICROBIANOS EN LAS POBLACIONES: <i>de la salud a la enfermedad</i>	62
4.1. <i>Microbioma Subgingival</i>	63
4.1.1. <i>Integrantes cultivables, no cultivables y difícilmente cultivables del microbioma subgingival</i>	63
4.1.2. <i>El microbioma subgingival en diferentes condiciones periodontales y poblaciones</i>	66
4.1.3. <i>El microbioma subgingival en España y Colombia</i>	72
4.1.2. <i>Influencia del microbioma subgingival en la salud y en la enfermedad periodontal</i>	74
3. Justificación.....	80

4. Hipótesis.....	85
5. Objetivos.....	89
6. Metodología.....	93
7. Resultados.....	107
8. Discusión.....	132
9. Conclusión.....	153
10. Referencias.....	157
11. Anexos.....	183

1. RESUMEN

A magnifying glass icon with a dark grey handle and frame, positioned over the word 'RESUMEN'. The magnifying glass is tilted slightly to the right, and its lens is centered over the letters 'E' and 'N' of the word. The word 'RESUMEN' is written in a dark blue, serif font.

Caracterización del Microbioma Subgingival en Pacientes con Periodontitis en España y Colombia

Introducción

La periodontitis, recientemente clasificada en estadios y grados siguiendo los criterios de la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018, es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial y multidimensional, con una etiología polimicrobiana compleja. Es una enfermedad muy prevalente y su frecuencia puede variar según las condiciones económicas, culturales, sociales y étnicas de las poblaciones. Su principal factor etiológico son las comunidades bacterianas organizadas en biopelículas subgingivales las cuales resultan principalmente de cambios ecológicos en su estructura y por el aumento de la biomasa microbiana total. Se han identificado más de 700 especies o taxones bacterianos diferentes en el microbioma subgingival cultivables, no cultivables y difícilmente cultivables, las cuales han sido poco estudiadas entre poblaciones. Además, la mayoría de los estudios que las han caracterizado presentan variabilidad en las definiciones de caso utilizadas para seleccionar pacientes con periodontitis y han empleado técnicas de detección molecular de manera exclusiva, utilizando sistemas inexactos de agrupación entre secuencias, y con el riesgo de subestimar un siglo de historia del cultivo.

Justificación y Objetivos

Por tanto, debido al advenimiento de la nueva clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias de 2018, se hace necesario caracterizar y comparar el microbioma subgingival, mediante el uso de cultivo bacteriano en combinación con la secuenciación del gen ARNr 16S, en pacientes de distintas poblaciones diagnosticados con este nuevo sistema de clasificación.

Para resolver el problema de investigación de la presente tesis doctoral, se llevaron a cabo dos estudios. El **Estudio #1**, tuvo el objetivo específico de caracterizar y comparar la

microbiota subgingival en pacientes diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias 2018, utilizando cultivo bacteriano. El objetivo específico del **Estudio #2**, fue el de caracterizar y comparar el microbioma subgingival en pacientes de España y Colombia, diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias 2018, utilizando la técnica de secuenciación de próxima generación del gen ribosómico 16S.

Material y Métodos

Ambos (**Estudio #1** y **Estudio #2**) tienen como base un estudio de corte transversal, donde se tomaron muestras subgingivales de sujetos españoles y colombianos distribuidos en tres grupos (salud/gingivitis, periodontitis en estadios I-II o estadios III-IV). En el caso del **Estudio #1** las muestras subgingivales se procesaron por cultivo y las comparaciones entre pacientes según estado periodontal (y entre países) se realizaron mediante pruebas de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, ANOVA y chi-cuadrado. En el **Estudio #2** el procesamiento de las muestras subgingivales fue mediante secuenciación del gen ARNr 16S, las variables clínicas se compararon mediante la prueba ANOVA o Kruskal-Wallis, los estimadores de diversidad entre los estados periodontales se calcularon mediante Kruskal-Wallis y la identificación de las diferencias en las proporciones medias de taxones bacterianos según el estado periodontal, se determinó con el test de t de Welch.

Resultados

En el **Estudio #1**, la muestra final estuvo formada por 167 sujetos. *Eikenella corrodens* y *Parvimonas micra* se detectaron con mayor frecuencia en salud/gingivitis y *Porphyromonas gingivalis* en periodontitis ($p < 0,05$). Se observaron recuentos totales más altos en Colombia ($p = 0,036$). En España se observaron niveles significativamente superiores de *P. gingivalis* y *Campylobacter rectus*, y de *Tannerella forsythia*, *P. micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus* y *Capnocytophaga* spp. en Colombia ($p < 0,001$). *P. micra* fue más prevalente en salud/gingivitis y periodontitis estadios I-II en Colombia, y *P. gingivalis* en todos los grupos de periodontitis en España ($p < 0,05$).

En el **Estudio #2**, la muestra final fue de 60 pacientes (30 por país - 10 para cada grupo de estudio), pareados por condición periodontal, género y edad (± 5 años). Colombia presentó una riqueza y una diversidad ligeramente mayor que España. Las especies con mayor Abundancia Relativa, fueron similares en ambas poblaciones y para todos los grupos de estadios de periodontitis, entre los que estuvieron: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT 203, *Filifactor alocis*, Taxones sin asignación, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041. En España hubo mayores proporciones en periodontitis sobre todo de *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5][*Eubacterium*]*_saphenum* y *T. forsythia* ($p < 0,05$), y en Colombia sobre todo de *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-6][*Eubacterium*]*_nodatum*, Taxones sin asignación, *P. gingivalis* y *Treponema denticola* ($p < 0,05$). Los españoles presentaron mayores proporciones en salud/gingivitis de Taxones sin asignación y *Streptococcus intermedius* ($p < 0,05$), y en Colombia de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Granulicatella adiacens*, *Rothia dentocariosa*, *Leptotrichia hongkongensis*, *Bergeyella* sp. y *Rothia aerea* ($p < 0,05$). Entre los estadios de la periodontitis, hubo mayores proporciones en España en estadios III-IV de *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy*, *Desulfobulbus* sp. HMT 041, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369 ($p < 0,05$), y en Colombia en estadios I-II de *Leptotrichia* sp. HMT 417 y *Campylobacter gracilis* ($p < 0,05$). El grado C evidenció mayores proporciones de *Desulfobulbus* sp. HMT 041, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy* ($p < 0,05$) en España, y de *Filifactor alocis* ($p < 0,05$) en Colombia.

Conclusiones

Se concluye entonces del **Estudio #1**, que se detectaron diferencias significativas en la microbiota entre salud/gingivitis y periodontitis, con diferencias menores entre los estadios de periodontitis. Las diferencias también fueron relevantes entre países, con Colombia mostrando mayores recuentos y variabilidad de especies bacterianas. Del **Estudio #2** se concluye, preliminarmente, que se detectaron diferencias significativas en el microbioma subgingival entre los países. Los patobiontes no cultivables y difícilmente cultivables,

podrían discriminar entre los estados periodontales. El hallazgo de Taxones sin asignación despierta el interés en el conocimiento de su papel en la salud y en las enfermedades periodontales. La riqueza sutilmente mayor en Colombia y los demás hallazgos del presente estudio, sugieren que las características de las poblaciones jugaron un papel importante en los resultados microbiológicos obtenidos.

De ambos estudios se puede concluir, que se evidenciaron diferencias al comparar el microbioma subgingival de dos poblaciones distintas, diagnosticadas según la clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias 2018.

Palabras Clave: Periodontitis; Microbioma subgingival; Cultivo microbiológico; Secuenciación; España; Colombia.

Characterization of the Subgingival Microbiome in Patients with Periodontitis in Spain and Colombia

Introduction

Periodontitis, recently classified into stages and grades following the criteria of the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions 2018, is a multifactorial and multidimensional chronic inflammatory disease with a complex polymicrobial etiology. It is a very prevalent disease, and its frequency may vary according to the economic, cultural, social, and ethnic conditions of the populations. Its main etiological factor is the bacterial communities organized in subgingival biofilms, which mainly result from ecological changes in their structure and from the increase in total microbial biomass. More than 700 different bacterial species or taxa have been identified in the subgingival microbiome cultivable, non-cultivable, and difficult to cultivate, which have been little studied among populations. In addition, most of the studies that have characterized them present variability in the case definitions used to select patients with periodontitis and have exclusively used molecular detection techniques, using inexact grouping systems between sequences, and at the risk of underestimating a century of cultivation history.

Justification and Objectives

Therefore, due to the advent of the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions 2018, it is necessary to characterize the subgingival microbiome, through the use of bacterial culture combined with the 16S rRNA gene sequencing, in patients from different populations diagnosed with this new classification system.

Two studies were carried out to resolve the research problem of this doctoral thesis. **Study #1** had the specific objective of characterizing and comparing the subgingival microbiota in patients diagnosed according to the classification of periodontal and peri-Implant diseases

and conditions 2018, using bacterial culture. The specific objective of **Study #2** was to characterize and compare the subgingival microbiome in patients from Spain and Colombia, diagnosed according to the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions 2018, using the next generation 16S ribosomal gene sequencing technique.

Methods

Both (**Study #1** and **Study #2**) are based on a cross-sectional study, where subgingival samples were taken from Spanish and Colombian subjects distributed in three groups (health/gingivitis, periodontitis in stages I-II or stages III-IV). In the case of **Study #1**, subgingival samples were processed by culture, and comparisons among patients according to periodontal status (and between countries) were made using Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, ANOVA, and chi-square tests. In **Study #2**, the processing of the subgingival samples was by 16S rRNA gene sequencing, the clinical variables were compared using the ANOVA or Kruskal-Wallis test, the diversity estimators among the periodontal status were calculated using Kruskal-Wallis, and the identification of the differences in the mean proportions of bacterial taxa according to the periodontal status, was determined with the Welch's t-test.

Results

In **Study #1**, the final sample consisted of 167 subjects. *Eikenella corrodens* and *Parvimonas micra* were more frequently detected in health/gingivitis and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis ($p < 0.05$). Higher total counts were observed in Colombia ($p = 0.036$). In Spain, significantly higher levels of *P. gingivalis* and *Campylobacter rectus* were observed, and of *Tannerella forsythia*, *P. micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus* and *Capnocytophaga* spp. in Colombia ($p < 0.001$). *P. micra* was more prevalent in health/gingivitis and periodontitis stages I-II in Colombia, and *P. gingivalis* in all periodontitis groups in Spain ($p < 0.05$). In **Study #2**, the final sample consisted of 60 patients (30 per country - 10 for each study group, matched by periodontal condition, gender, and age (± 5 years)). The species with the highest Relative Abundance were similar

in both populations and for all groups of periodontitis stages, among which were: *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT 203, *Filifactor alocis*, Unassigned Taxons, *Peptostreptococcaceae [XI][G-9][Eubacterium]_brachy* and *Desulfobulbus* sp. HMT 041. In Spain, there were higher proportions in periodontitis, especially *Peptostreptococcaceae [XI][G-9] [Eubacterium]_brachy*, *Peptostreptococcaceae [XI][G-5][Eubacterium] saphenum* y *T. forsythia* ($p<0.05$), and in Colombia, above all, *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcaceae [XI][G-6][Eubacterium] nodatum*, Unassigned Taxa, *P. gingivalis* and *Treponema denticola* ($p<0.05$). The Spaniards presented higher proportions in health/gingivitis of Unassigned Taxa and *Streptococcus intermedius* ($p<0.05$), and in Colombia of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Granulicatella adiacens*, *Rothia dentocariosa*, *Leptotrichia hongkongensis*, *Bergeyella* sp. and *Rothia aeria* ($p<0.05$). Among the stages of periodontitis, there were higher proportions in Spain in stages III-IV of *Peptostreptococcaceae [XI] [G-9] [Eubacterium] _brachy*, *Desulfobulbus* sp. HMT 041, *Peptostreptococcaceae [XI] [G-4] bacterium* HMT 369 ($p<0.05$), and in Colombia in stages I-II of *Leptotrichia* sp. HMT 417 and *Campylobacter gracilis* ($p<0.05$). Grade C showed higher proportions of *Desulfobulbus* sp. HMT 041, *Peptostreptococcaceae [XI] [G-9][Eubacterium] _brachy* ($p<0.05$) in Spain, and *Filifactor alocis* ($p<0.05$) in Colombia.

Conclusions

It is concluded then from **Study #1**, that significant differences were detected in the microbiota among health/gingivitis and periodontitis, with minor differences between stages of periodontitis. Differences were also relevant between countries, with Colombia showing larger counts and variability of bacterial species. From **Study #2**, it is preliminarily concluded that significant differences were detected in the subgingival microbiome between countries. Non-cultivable and difficult to cultivate pathobionts could discriminate among periodontal status. The finding of Unassigned Taxa arouses interest in the study of their role in health and periodontal diseases. The slightly higher richness in Colombia and the other findings of the present study suggest that the characteristics of the populations played an essential role in the microbiological results obtained.

From both studies, it can be concluded that differences were evidenced when comparing the subgingival microbiome of two different populations, diagnosed according to the 2018 classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions.

Keywords: Periodontitis; Subgingival microbiome; Microbiological culture; Sequencing; Spain; Colombia.

2. INTRODUCCIÓN

A magnifying glass icon with a dark grey handle and frame, positioned over the word 'INTRODUCCIÓN'. The lens of the magnifying glass is centered over the word, making it appear larger and more prominent. The text '2. INTRODUCCIÓN' is written in a dark blue, serif font.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial (Caton y col., 2018; Papapanou y col., 2018) con una etiología polimicrobiana compleja (Curtis y col., 2020; Abusleme y col., 2021), que afecta a una gran proporción de adultos en diferentes poblaciones dependiendo de factores como la etnia (Carasol y col., 2016; Kassebaum y col., 2014). Es una enfermedad muy prevalente, con una incidencia aproximada de periodontitis avanzada estandarizada por edad de 701 casos por 100.000 personas al año. Es decir, que un caso nuevo de periodontitis avanzada se desarrollará anualmente, a partir de un seguimiento de 142 personas, lo cual representa un desafío importante en los programas de salud pública dental en todo el mundo (Kassebaum y col., 2014).

El factor etiológico principal de la periodontitis son las comunidades bacterianas subgingivales (Teles y col., 2013; Holt y col., 2005; Abusleme y col., 2021), en las cuales los eventos ecológicos promueven las transiciones de una etapa simbiótica a una disbiótica, mediante estímulos microbianos específicos, acompañados de determinantes genéticos y ambientales que modifican la respuesta del huésped, y desencadenan el desarrollo de la enfermedad (Abusleme y col., 2021; Curtis y col., 2020; Hajishengallis y col., 2012).

Hasta la fecha se han identificado un gran número de especies bacterianas diferentes en el microbioma subgingival (Teles y col., 2013; Holt y col., 2005; Haffajee y col., 2004), entre las cuales estarían los llamados patógenos clave (Abusleme y col., 2021; Hajishengallis y col., 2012), junto con nuevos géneros microbianos no cultivables o difícilmente cultivables, que estarían incluso mayormente asociados a las lesiones periodontales y su gravedad (Pérez-Chaparro y col., 2014).

La periodontitis ha sido clasificada recientemente en etapas y grados siguiendo los criterios del Taller Mundial sobre la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias (Caton y col., 2018; Papapanou y col., 2018), para unificar y actualizar el diagnóstico clínico de la enfermedad.

1. DIAGNÓSTICO PERIODONTAL:

la era de los estadios y grados.

1.1. EL PUNTO DE PARTIDA.

Ha habido una amplia gama de conceptos sobre la patobiología de las periodontitis (Slots, 2017), refiriéndose principalmente a si estaba infradiagnosticada, sobrediagnosticada, ambas o ninguna. La respuesta ha sido "ambas", pero sobre todo sobrediagnosticada (Papapanou y col., 2017).

El dilema ha estado centrado sobre todo en si "las presentaciones de casos fenotípicamente diferentes representan diferentes enfermedades, o simplemente variaciones de una sola enfermedad" (Tonetti y col., 2018). Esto ha desencadenado desde hace algunas décadas en la necesidad de hacer cambios en el sistema de clasificación periodontal (Nevis y col., 1994), los que en principio resolvieran los acuerdos o diferencias sobre este tema.

El énfasis en tener en cuenta las características individuales o fenotípicas de la periodontitis entre las que están: la identificación de sus agentes etiológicos (bacterias específicas o complejos bacterianos) (Socransky y col, 1998), el reconocimiento de los múltiples factores de riesgo modificables asociados a su aparición y desarrollo (Papapanou, 1998), y la susceptibilidad genética a desarrollarlas (Michalowicz y col., 1990), motivó el World Workshop de Periodoncia de 1999 intentando centrarse en la resolución de los casos según sus complejidades particulares (Armitage, 1999). Sin embargo, a pesar de que esta clasificación intentó solucionar dificultades en cuanto a la aplicabilidad clínica y a la necesidad de establecer las características individuales entre las formas de la enfermedad, no fue muy clara en las diferencias entre periodontitis crónica y agresiva (van der Velden, 2017).

Los términos "agresivo" y "crónico" prácticamente no transmitían información sobre etiologías específicas o factores de riesgo que pudieran orientar las terapias preventivas y curativas (van der Velden, 2017), lo que supuso una barrera al momento de la aplicación

del sistema de clasificación (Tonetti y col., 2018). Además, estas características de la enfermedad podían ayudar a identificar una periodontitis estable, pero no progresiva. La incapacidad para proporcionar información de alta confianza sobre la progresión de la enfermedad, resultó en un diagnóstico erróneo y en un tratamiento excesivo o insuficiente (Slots, 2017).

Por lo expuesto, la comunidad científica periodontal (investigadora y clínica) expresó su preocupación por la capacidad para diferenciar correctamente entre los casos de periodontitis, por lo que fue necesario convocar un nuevo World Workshop de clasificación en 2017 (Caton y col., 2018).

1.2. LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES Y CONDICIONES PERIODONTALES Y PERIIMPLANTARIAS 2018.

Un comité expertos formado representantes de la Federación Europea de Periodoncia (EFP) y de la Asociación Americana de Periodoncia (AAP), junto con representantes del resto del mundo, se reunió en el World Workshop de 2017 sobre la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias. Se elaboraron 19 artículos de revisión y cuatro informes de consenso, con el objetivo de alinear y actualizar el esquema de clasificación y la comprensión actual de la salud clínica a la periodontitis (Caton y col., 2018), abordando los problemas no resueltos con la clasificación anterior (Armitage, 1999).

Entre los resultados del World Workshop de 2017, se identificó la salud clínica y se definió un caso de inflamación gingival, teniendo en cuenta el sangrado al sondaje como parámetro principal para establecer umbrales para la gingivitis (Lang y col., 2018; Trombelli y col., 2018). También se caracterizaron la salud periodontal y la gingivitis en un periodonto reducido luego del tratamiento exitoso de la periodontitis, con el objetivo de establecer la necesidad de mantenimiento riguroso en estos pacientes.

Se aceptó que un paciente con gingivitis puede volver a un estado de salud, pero que un paciente con periodontitis sigue siendo un paciente con periodontitis, aunque haya tenido éxito terapéutico, manteniendo los cuidados de apoyo de por vida para prevenir la

recurrencia de la enfermedad (Chapple y col., 2018). Igualmente se revisó el sistema de clasificación de la periodontitis, para incorporar nuevos conocimientos relevantes para su epidemiología, etiología y patogénesis, y así proponer un nuevo marco de clasificación. Por lo tanto, se encargaron, redactaron, revisaron por pares y aceptaron, cinco documentos de posición (Papapanou y col., 2018), con el objetivo clínico de individualizar el diagnóstico y de establecer la definición de caso de un paciente con periodontitis, “teniendo en cuenta la dimensión conocida de la etiología multifactorial para mejorar el pronóstico, además de tener en cuenta la complejidad y el riesgo, y proporcionar un nivel de atención adecuado” (Tonetti y col., 2018). Todos los hallazgos y recomendaciones del World Workshop de 2017 fueron acordados por consenso. Una vez expuesto lo establecido y las tareas por desarrollar, a continuación se publicaron y difundieron las conclusiones del World Workshop de 2017 (Caton y col., 2018).

Se empezó por rediseñar el Modelo de la Patología Multifactorial de la Periodontitis de Page y Kornman de 1997, en el que se incorporó la salud gingival y se dio mucha más importancia a los factores de riesgo ambientales, genéticos y epigenéticos, que podrían estar involucrados en el proceso de salud enfermedad (Figura 1).

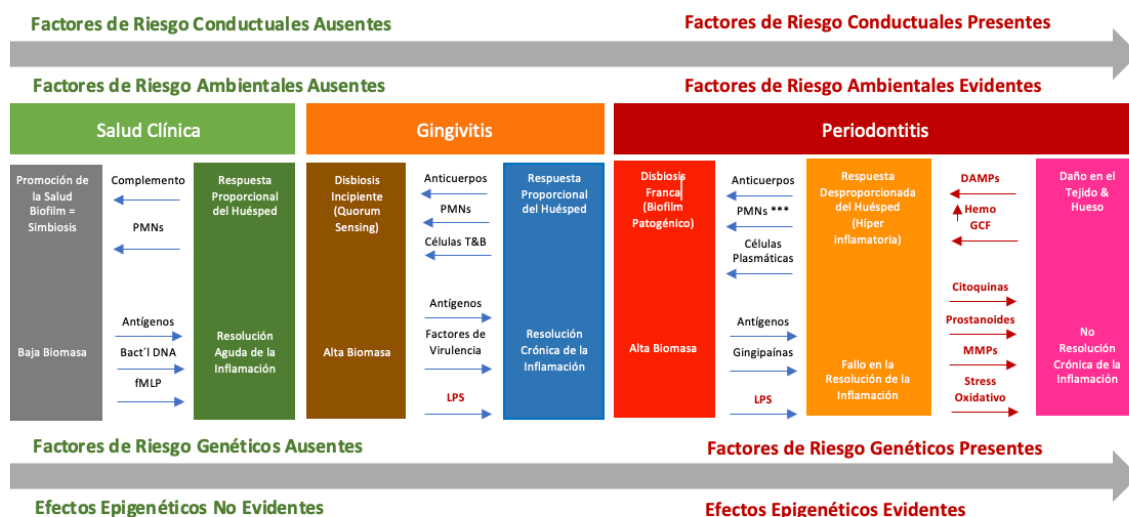


Figura 1. Esquema sacado y adaptado de Meyle y Chapple 2015. Modelo contemporáneo de interacciones huésped-microbio en la patología de la periodontitis. La salud clínica asume algunos cambios inflamatorios leves que son proporcionales al mantenimiento de una microbiota periodontal residente que 'promueve la salud'. La relación es simbiótica, con el anfitrión viviendo en armonía con sus microbios. la respuesta del huésped impulsa una disbiosis incipiente (gingivitis). Si la biopelícula no se altera/elimina, y dependiendo de varios factores de riesgo genéticos, ambientales y de estilo de vida, algunos pacientes susceptibles se produce una disbiosis franca y se perpetúa una inflamación destructiva y crónica que no se resuelve (periodontitis). DAMPs, patrones moleculares asociados a daños; fMLP, N-formilmetionil-leucilfenilalanina; GCF, líquido crevicular gingival; LPS, lipopolisacárido; MMPs, metaloproteinasas de matriz; PMNs, neutrófilos polimorfonucleares.

1.3. SALUD GINGIVAL CLÍNICA.

Teniendo en cuenta las limitaciones de las antiguas clasificaciones para definir salud, el World Workshop de 2017 creó una definición clara de salud periodontal, tanto a nivel histológico como clínico (Chapple, 2019).

Definir la salud periodontal es muy importante si se quiere tener un punto de referencia común para evaluar la enfermedad periodontal y determinar los resultados significativos del tratamiento. La salud periodontal debe definirse entonces, como un estado libre de enfermedad periodontal inflamatoria (Lang y col., 2018; Chapple y col., 2018). El término clínicamente sano debe adoptarse para cubrir la ausencia (o una reducción muy significativa) de la inflamación periodontal clínica en un periodonto anatómicamente intacto o en un periodonto reducido. Por tanto, se debió desarrollar una definición para la salud periodontal clínica en las personas que hayan experimentado gingivitis o periodontitis, que se sometieron a tratamiento y que luego regresaron a un estado de salud clínica con un periodonto intacto (en el caso de gingivitis) o un periodonto reducido (en el caso de periodontitis) (Lang y col., 2018; Chapple y col., 2018).

Es así que, según los nuevos parámetros de clasificación, la salud periodontal puede existir antes de que comience la enfermedad, pero, a la inversa, la salud periodontal se puede restaurar a un periodonto anatómicamente reducido (Lang y col., 2018; Chapple y col., 2018).

Biología de la salud gingival clínica:

Se asocia con un infiltrado inflamatorio (predominantemente neutrofílico) y una respuesta del huésped compatible con la homeostasis (Lang y col., 2018; Chapple y col., 2018).

Clasificación de la salud gingival clínica a nivel de localización:

- Salud gingival clínica en un periodonto intacto (ausencia de pérdida de inserción y/o pérdida ósea).

- Salud gingival clínica en un periodonto reducido (en paciente con periodontitis estable, o en paciente sin periodontitis) (Chapple y col., 2018).

Características clínicas de Salud Gingival en un periodonto intacto:

- Ausencia de sangrado al sondaje, eritema y edema, síntomas del paciente y pérdida de inserción y hueso.
- Los niveles fisiológicos óseos oscilan entre 1,0 y 3,0 mm apical a la unión cemento-esmalte (Chapple y col., 2018).

Características clínicas de salud gingival en un periodonto reducido:

- Ausencia de sangrado al sondaje, eritema, edema y síntomas del paciente, en presencia de niveles óseos y de inserción clínica reducidos.
- Persiste el riesgo de progresión recurrente de la periodontitis en pacientes periodontales.
- En pacientes sin periodontitis, no existe evidencia actual de un mayor riesgo de periodontitis (Chapple y col., 2018).

Definir la salud gingival con fines epidemiológicos:

Para un periodonto intacto y un periodonto reducido y estable, la salud gingival se define como <10% de las localizaciones con sangrado y profundidades de sondaje ≤ 3 mm (Chapple y col., 2018; Trombelli y col., 2018; Ramseier y col., 2015).

1.4. GINGIVITIS INDUCIDA POR BIOFILM DENTAL.

El World Workshop de 2017 utilizó un método simple para definir gingivitis, entre las que está la gingivitis inducida por biofilm dental (Chapple, 2019).

La gingivitis inducida por biofilm dental, es la lesión inflamatoria que se localiza en la encía, que no se extiende más allá de la unión mucogingival y que se inicia debido al desarrollo de una disbiosis incipiente en un huésped susceptible (cuando el biofilm dental se acumula durante días o semanas sin remoción de manera local debajo del margen gingival). Incluso,

aunque los niveles de biofilm dental se minimicen, existe un infiltrado inflamatorio dentro de los tejidos gingivales, como parte del proceso fisiológico - inmunológico (Chapple y col., 2018). Las características de estas afecciones gingivales incluyen: signos y síntomas clínicos de inflamación que se limitan a la encía libre y adherida, y no se extienden más allá de la línea mucogingival, reversibilidad de la inflamación al eliminar la biopelícula; presencia de una alta carga de biofilm dental para iniciar y/o exacerbar la gravedad de la lesión (aunque esto varía entre individuos), y niveles de inserción estables (es decir, invariables) en un periodonto que puede haber experimentado o no una pérdida de inserción, o de hueso alveolar (Chapple y col., 2018).

Biología de la gingivitis inducida por biofilm dental:

Se asocia con un infiltrado inflamatorio y una respuesta del huésped compatible con la disbiosis (Chapple y col., 2018).

Clasificación de la gingivitis inducida por biofilm dental a nivel de localización:

Dependiendo de si la inflamación gingival inducida por la biofilm dental ocurre en un periodonto intacto o reducido (recesión), o en un paciente diagnosticado con periodontitis, la gingivitis puede clasificarse además como:

- Gingivitis en un periodonto intacto.
- Gingivitis en un periodonto reducido en un paciente sin periodontitis.
- Inflamación gingival en un periodonto reducido en un paciente con periodontitis tratada con éxito (Chapple y col., 2018).

Determinantes de la tasa de desarrollo de la gingivitis inducida por biofilm dental:

Además, deben tenerse en cuenta para el nuevo diagnóstico, los factores de riesgo asociados al desarrollo de la enfermedad, entre los que están (Chapple y col., 2018):

Factores de Riesgo Locales (factores predisponentes) (Murakami y col., 2018):

Son aquellos que fomentan la acumulación de biofilm dental en una localización específica, ya sea impidiendo su eliminación durante la higiene bucal diaria, y/o creando un ambiente propicio para su acumulación. Estos pueden ser:

- a) Factores de retención de biofilm dental, por anatomía o malposición dental, por iatrogenias (prótesis y/o restauraciones desadaptadas), por tratamientos ortodónticos, entre otros.
- b) Sequedad oral que se manifiesta como una falta de flujo salival, disponibilidad o cambios en la calidad de la saliva, lo que lleva a una limpieza reducida de las superficies de los dientes (Mizutani y col., 2015).

Factores de Riesgo Sistémicos (factores modificadores):

Son las características presentes en un individuo, que influyen negativamente en la respuesta inmunoinflamatoria a una determinada carga de biofilm dental, lo que resulta en una inflamación importante. Algunos ejemplos son:

- a) Hábito de fumar: debido a la vasoconstricción microvascular local y a la fibrosis, lo que podría enmascarar las manifestaciones clínicas del infiltrado celular inflamatorio patológico subyacente (Warnakulasuriya y col., 2010).
- b) Factores metabólicos: hiperglucemia en personas con o sin diabetes. La formación de productos finales de glicación avanzada, que pueden activar cascadas de señalización y eventos proinflamatorios (Chapple y col., 2013).
- c) Factores nutricionales: la deficiencia severa de vitamina C, o escorbuto, da como resultado un debilitamiento de las paredes de los vasos sanguíneos capilares, y la subsiguiente propensión a una mayor hemorragia gingival (van der Velden y col., 2011).
- d) Agentes farmacológicos: pueden reducir el flujo salival, afectar la función endocrina e inducir agrandamiento gingival y pseudobolsas.
- e) Aumento de las hormonas esteroides sexuales: en la pubertad, durante el embarazo o después de la medicación con anticonceptivos orales de primera generación (hay poca evidencia de respuestas inflamatorias gingivales exageradas a la placa con

dichos fármacos), pueden modificar la respuesta inflamatoria gingival (Trombelli y col., 2013).

- f) Afecciones hematológicas: las neoplasias sanguíneas particulares, o pre malignas, se asocian con signos de inflamación gingival excesiva en ausencia de una acumulación aumentada de biofilm dental (Lynch y col., 1967).

Definir la gingivitis inducida por biofilm dental con fines epidemiológicos:

A efectos epidemiológicos, la gingivitis en un periodonto intacto y la gingivitis en un periodonto reducido en un paciente sin antecedentes de periodontitis, se define como $\geq 10\%$ de localizaciones con hemorragia, con profundidades de sondaje $\leq 3\text{mm}$ (Chapple y col., 2018; Trombelli y col., 2018).

1.5. PERIODONTITIS.

Según el World Workshop de 2017, se redefinió la Periodontitis (según ya fue expuesto) como una “enfermedad inflamatoria (categoría única) crónica multifactorial y multidimensional, asociada con biopelículas de placa disbiótica y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte dentario” (Papapanou y col., 2018). Sus características principales incluyen: la pérdida de soporte del tejido periodontal (traducido en pérdida de inserción clínica (CAL) y en pérdida ósea radiográfica (RBL)), la presencia de bolsas periodontales y la evidencia de sangrado gingival (Papapanou y col., 2018).

Además de la redefinición de la Periodontitis, los expertos llegaron a cuatro conclusiones luego de revisar la evidencia al respecto (Tomado textual de Tonetti y col., 2018):

“1. No hay evidencia de una fisiopatología específica que permita diferenciar entre casos de periodontitis “agresiva” o “crónica” o que sirva de guía sobre los diferentes tipos de intervenciones.

2. Hay poca evidencia consistente que avale que la periodontitis agresiva y crónica sean enfermedades diferentes. Pero existe evidencia de que múltiples factores, y las

interacciones entre ellos, influyen en los resultados patológicos clínicamente observables (fenotipos) a nivel individual.

3. A nivel poblacional, las tasas medias de progresión de periodontitis son consistentes en todas las poblaciones observadas en el mundo. Aun así, hay evidencia de que segmentos específicos de la población presentan niveles diferentes de progresión de la enfermedad.

4. Un sistema de clasificación basado únicamente en la gravedad de la patología no registra dimensiones importantes de la enfermedad de una persona, incluyendo la complejidad (que influye en los enfoques terapéuticos) y los factores de riesgo (que influyen en los resultados de la enfermedad)”.

Bajo estas cuatro conclusiones se procedió entonces, entre otras acciones, a crear un nuevo esquema de clasificación de la periodontitis basado en estadios y grados, como se describe a continuación.

Estadios:

Las formas de la enfermedad previamente reconocidos como “crónica” o “agresivo”, ahora se han agrupado en una sola entidad, "periodontitis", utilizando un sistema de clasificación detallado de estadios multidimensional (Caton y col., 2018; Papapanou y col., 2018; Needleman y col., 2018; Tonetti y col., 2018). Estos estadios dependen de: la gravedad de la enfermedad, de su extensión y de la complejidad de su manejo y tratamiento, lo que incluso podría repercutir sistémicamente en el paciente (Papapanou y col., 2018; Tonetti y col., 2018). Se basa en cuatro estadios (estadios del I al IV) los cuales se determinan según: la pérdida de inserción clínica, la cantidad y porcentaje de pérdida ósea, la profundidad de sondaje, la presencia y extensión de defectos óseos angulares y compromiso de furca, la movilidad dentaria, y la pérdida de dientes debido a la periodontitis (Tonetti y col., 2018; Tonetti y Sanz, 2019 a; Tonetti y Sanz, 2019 b) (Tabla 1).

a) Periodontitis en Estadio I:

Se refiere al límite entre la gingivitis y la periodontitis y representa las primeras etapas de la pérdida de inserción. Es más que un simple diagnóstico prematuro. Se cree que podría

constituir el primer indicio de periodontitis en pacientes jóvenes, y el manejo es relativamente simple.

Sus características clínicas son:

- Pérdida ósea radiográfica inferior al 15%.
- Pérdida de inserción clínica interproximal entre 1-2mm.

b) Periodontitis en Estadio II:

Se refiere a la periodontitis establecida, y sigue manteniendo al igual que la periodontitis en estadio I, un manejo relativamente simple para muchos casos, pero con un monitoreo más minucioso.

Sus características clínicas son:

- Pérdida ósea radiográfica inferior al 15% y 33%.
- Pérdida de inserción clínica interproximal entre 3-4mm.

c) Periodontitis en Estadio III:

Se presenta daño significativo en el periodonto, que podría terminar en la pérdida de dientes.

Sus características clínicas son:

- Pérdida ósea radiográfica con afectación del tercio medio o más de la raíz.
- Pérdida de inserción clínica interproximal entre 5mm o más.
- Pérdida dental por periodontitis de hasta 4 dientes (en algunos casos se puede cumplir).
- No existe aún afectación de la oclusión.
- Ausencia de colapso de la mordida, migraciones, abanicamiento dentario o defectos graves de la cresta ósea.

d) Periodontitis en Estadio IV:

Es la etapa más severa y avanzada, produciéndose lesión considerable de soporte periodontal, que puede desencadenar en pérdida significativa de dientes, con la consecuente pérdida de la función masticatoria.

Sus características clínicas son:

- Pérdida ósea radiográfica con afectación del tercio medio o más de la raíz.

- Pérdida de inserción clínica interproximal entre 5mm o más.
- Pérdida dental por periodontitis de más de 4 dientes (en algunos casos se puede cumplir).
- Existe afectación de la oclusión.
- Presencia de colapso de la mordida, migraciones, abanicamiento dentario o alguna lesión grave de la cresta ósea.

		ESTADIOS DE LA PERIODONTITIS			
COMPONENTE	ELEMENTO	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
SEVERIDAD	CAL interdental en la localización de mayor pérdida	1-2 mm	3-4 mm	>=5mm o extendiéndose al tercio medio radicular.	>=8 mm o extendiéndose al tercio apical de la raíz.
	Pérdida de hueso radiográfica	Tercio coronal (<15%).	Tercio coronal (15-33%).	Extendiéndose al tercio medio.	Extendiéndose al tercio apical.
	Pérdida de dientes	No hay pérdida de dientes por periodontitis.	No hay pérdida de dientes por periodontitis.	<=4 dientes perdidos por periodontitis.	>=5 dientes perdidos por periodontitis.
COMPLEJIDAD	Local	Profundidad de sondaje 3-4. Principalmente pérdida de hueso horizontal.	Profundidad de sondaje 4-5 Principalmente pérdida de hueso horizontal.	Además de la complejidad del Estadio II: Profundidad de sondaje >= 6. Pérdida vertical de hueso >= 3. Lesión de furca II o III Dientes remanentes 21-28. Defecto moderado de la cresta ósea.	Además de la Complejidad del Estadio III: Disfunción masticatoria. Traumatismo oclusal secundario (movilidad de los dientes >= 2). Colapso de la mordida. Dientes remanentes <= 20. Defecto severo de la cresta ósea.

Tabla 1. Tomado y adaptado de Papapanou y col., 2018. Características de los estadios de la Periodontitis. CAL: pérdida de inserción clínica.

Grados:

Los grados, al igual que los estadios, también pueden influir en la complejidad del tratamiento de la enfermedad (Tonetti y col., 2018; Tonetti y Sanz, 2019 a; Tonetti y Sanz, 2019 b).

Además de los estadios, la nueva clasificación contempla tres grados de progresión de la enfermedad, que podrían impactar el estado de salud general del paciente, y que en algunos casos estarían asociados a factores como el tabaquismo o el nivel del control metabólico en la diabetes (Tonetti y col., 2018; Tonetti y Sanz, 2019 a; Tonetti y Sanz, 2019 b) (Tabla 2):

Para determinarlos, se planteó el uso de evidencia directa (antecedentes de pérdida ósea previa), así como evidencia de progresión indirecta (medición de la pérdida ósea radiográfica en porcentaje de la longitud de la raíz, dividida por la edad del paciente).

Por tanto los grados se definieron de la siguiente forma:

a) Grado A:

Riesgo de progresión bajo.

b) Grado B:

Riesgo de progresión moderado.

c) Grado C:

Riesgo de progresión alto.

Los grados, al igual que los estadios, también pueden influir en la complejidad del tratamiento de la enfermedad (Tonetti y col., 2018).

PROGRESIÓN			GRADOS DE LA PERIODONTITIS		
			Grado A	Grado B	Grado C
CRITERIO PRIMARIO	Evidencia DIRECTA de progresión.	Pérdida Ósea Radiográfica o Pérdida de Inserción Clínica	Sin pérdida ósea sobre 5 años	<2mm sobre 5 años	≥ 2mm sobre 5 años
	Evidencia INDIRECTA de progresión.	% Pérdida de Hueso/Edad	<0,25	0,25 a 1.0	>1.0
		Fenotipo del caso	Altos depósitos de biofilm, con bajos niveles de destrucción.	Destrucción concordante con los depósitos de biofilm.	La destrucción excede los depósitos de biofilm dados a la expectativa. Patrones clínicos específicos que sugieren períodos de progresión rápida y enfermedad de inicio temprano.
COMPLEJIDAD	Factores de Riesgo	Fumar	No fumador	<10 cigarrillos al día	≥10 cigarrillos al día
		Diabetes	Normoglicemia/no hay diagnóstico de diabetes.	HbA1c<7,09% en pacientes con diabetes.	HbA1c>7,09% en pacientes con diabetes.

Tabla 2. Tomado y adaptado de Papapanou y col., 2018. Características de los Grados de la Periodontitis.

Es importante tener en cuenta que después del tratamiento de la periodontitis, la evidencia ha demostrado que el paciente puede lograr la estabilidad periodontal. El paciente con periodontitis tratada y estable con salud gingival tiene mayor riesgo de periodontitis recurrente, y por tanto debe monitorizarse. La Figura 2, muestra las posibles situaciones que pueden aparecer tras el paso de la salud a la gingivitis y finalmente a la periodontitis (Chapple y col., 2018).

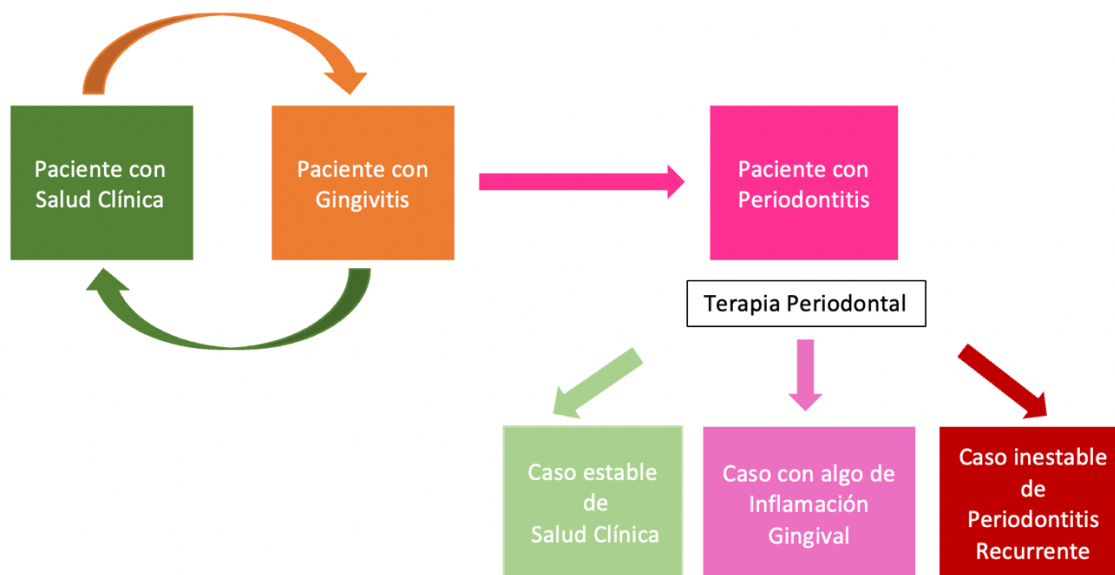


Figura 2. Esquema tomado y adaptado de Chapple y col., 2018. La transición de la salud periodontal a la gingivitis es reversible después de un tratamiento que resuelve la inflamación gingival. La transición a la periodontitis se traduce en una pérdida de inserción que, en la actualidad, es irreversible. Más importante aún, indica a los pacientes que tienen un alto riesgo de por vida de periodontitis recurrente. La terapia periodontal óptima puede restaurar la salud gingival en un periodonto reducido, o puede resultar en una inflamación gingival marginal leve a profundidades de bolsa de sondaje poco profundas (≤ 3 mm). Sin embargo, un historial de periodontitis coloca a los pacientes en alto riesgo de periodontitis recurrente y tales pacientes requieren un control cuidadoso específico durante los programas de mantenimiento periodontal.

Una vez expuestas las conclusiones y resultados emanados de los consensos, los integrantes del World Workshop de 2017 establecieron los interrogantes a responder en investigaciones futuras, en beneficio de documentar una mejor clasificación.

Por lo tanto la investigación de ahora en adelante debería estar encaminada, entre otros planteamientos, a (Papapanou y col., 2018):

- Ampliar las bases de datos epidemiológicas existentes para incluir regiones del mundo actualmente subrepresentadas, utilizando metodologías uniformes y estandarizadas, y capturando y reportando datos detallados sobre variables relacionadas con el paciente, orales y periodontales. El acceso abierto a los datos detallados es fundamental para facilitar análisis completos.

- Utilizar bases de datos existentes y desarrollar nuevas bases de datos que facilitarán la implementación, validación y perfeccionamiento continuo del sistema de clasificación de periodontitis recientemente introducido.
- Integrar plataformas de datos multidimensionales (clínicos, radiográficos, ómicos) para facilitar los enfoques de biología de sistemas para el estudio de enfermedades y afecciones periodontales y periimplantarias.
- Identificar marcadores genéticos, microbianos y asociados a la respuesta del huésped que diferencian entre distintos fenotipos de periodontitis o que pueden reflejar el inicio y la progresión de la periodontitis.

A continuación se revisan los temas relacionados con algunos de los planteamientos propuestos por el Wold Workshop del 2017.

2. BASES DE DATOS EPIDEMIOLÓGICAS:

la evidencia clínica.

Ha sido complejo extraer resultados concluyentes con respecto a la variación geográfica, y a las tendencias temporales de la incidencia y la prevalencia de la periodontitis (Frencken y col., 2017). Han existido dificultades al establecer la epidemiología global periodontal, por la variabilidad en la metodología de la evidencia disponible.

Las bases de datos han presentado heterogeneidad con respecto a los protocolos de registro periodontal (Slots, 2017; Frencken y col., 2017), a las definiciones de caso para establecer un diagnóstico de periodontitis, además de que solo se han incluido resultados parciales de la población en general (Frencken y col., 2017).

Al margen de los posibles fallos que hayan presentado los estudios epidemiológicos en periodoncia, son evidentes las tendencias generales sobre la naturaleza de las enfermedades periodontales en humanos.

No hay que olvidar que la periodontitis supone un impacto negativo plausible en la salud general, irrumpe en los sistemas de salud de las poblaciones, debido a que resulta en costos significativos de atención dental (Kinane y col, 2017), es una fuente de desigualdad social (Holt y col., 2005) y en muchas ocasiones incluso compromete la calidad de vida de quienes la padecen (Kutsal y col., 2021; Fischer y col., 2020).

2.1. EL MUNDO.

Se estima que la salud gingival no tienen una tendencia clara, además de ser poco probable para la mayoría de la población (Lang y col., 2018), y que la gingivitis inducida por biofilm dental tendría un alto porcentaje de aparición (hasta del 95%) en todas las edades en poblaciones dentadas, considerándose la forma más común de enfermedad periodontal (Dye, 2012; Murakami y col., 2018).

En el caso de la periodontitis, la evidencia existente coincide en que es una enfermedad prevalentemente alta (sin tendencia a la baja) sobre todo en adultos, con una afectación global de aproximadamente del 48%; 20% para sus formas leves, y de alrededor del 10% para las formas más severas (Marcenes y col., 2013; Kassebaum y col., 2014; Frencken y col., 2017; Slots, 2017).

Es dependiente en muchos casos de factores de riesgo (Kinane y col., 2017; Frencken y col., 2017), controversial en cuanto a su progresión en virtud de la edad (Papapanou y col., 2012; White y col., 2012; Kassebaum y col., 2014; Holtfreter y col., 2015; Eke y col., 2015; Carasol y col., 2016), y con una marcada variación geográfica (Bonfim y col., 2013; Kinane y col., 2017; Frencken y col., 2017).

2.2. ESPAÑA.

Se han llevado a cabo diferentes estudios basados en encuestas con parámetros homogéneos, que han documentado la prevalencia de las enfermedades periodontales en España, siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las encuestas de salud bucodental (OMS, 1997) (Llodra y col., 2002; Bravo y col., 2006; Llodra, 2012; Bravo y col., 2016; Carasol y col., 2016; Bravo y col., 2020).

Las conclusiones de la última encuesta realizada en 2020, donde además se comparan los resultados de las encuestas previas (Bravo y col., 2020) junto con las conclusiones del estudios de Carasol y col., en 2016, fueron las siguientes:

- Solamente el 36.7% de los españoles jóvenes, presenta un estado periodontal completamente sano (inferior al 46.0% reportado en 2015) (Bravo y col., 2020).
- Se observó un bajo porcentaje de sujetos con periodonto completamente sano, con un 18.1% en pacientes de 35 a 44 años, y un 9.6% en pacientes de 65 a 74 años, manteniéndose en niveles parecidos a los de la encuesta del 2015 (Bravo y col., 2016) (Bravo y col., 2020).
- La gingivitis se presentó en un 29.2% (Bravo y col., 2020).

- La prevalencia de bolsas periodontales ≥ 4 mm aumentó del 25,6% al 37,6%, al igual que la prevalencia de pérdida de inserción clínica de ≥ 4 mm disminuyó del 20,7% a 18,9% entre adultos jóvenes (de 35 a 44 años) entre el año 2000 y el estudio de Carasol y col. de 2016.
- La patología severa de bolsas y de pérdida de inserción ≥ 6 mm, afectó solo al 7.6% de los pacientes de 35 a 44 años, aumentado con respecto al 2015 (Bravo y col., 2016) (Bravo y col., 2020; Carasol y col., 2016).
- De los pacientes de 65 a 74 años, el 51.0% presentó alguna alteración periodontal (moderadas 22.9% y severa 11.6%).

En resumen, la patología periodontal en España, tiene una alta prevalencia pero una baja severidad.

2.3. COLOMBIA.

Se estima que la frecuencia media general de gingivitis en América Latina es del 34,7%, variando entre países del 24 al 77% (Caffesse, 2015).

En adición a las cifras mencionadas, el IV Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV, 2014), donde el componente periodontal fue evaluado en pacientes adolescentes y adultos (18 - 79 años), llegó a los siguientes resultados con respecto a la prevalencia de la periodontitis en Colombia:

- Morbilidad: se observó, en un 75% de los pacientes evaluados.
- Pérdida de soporte periodontal por curso de vida: Los resultados mostraron que se presentó más que todo entre los 35 y 79 años, con un porcentaje de pérdida de inserción de entre un 80 a un 100%, y que se incrementa a medida que aumenta la edad.
- Severidad de la pérdida de soporte: se observó que es más frecuente en su presentación leve (60%), lo que se traduce en una pérdida de inserción periodontal ≤ 2.9 mm.

Cabe anotar que, a este nivel, al momento de comparar los hallazgos obtenidos con el ENSAB III (ENSAB III, 1998), todos los resultados para el ENSAB IV (ENSAB IV, 2014) fueron mayores, haciéndose evidente un aumento del 20% en la pérdida de soporte periodontal leve, y en la disminución de los pacientes sin pérdida de soporte periodontal (25%), entre 1998 y 2014.

Se concluye entonces que al 2014, entre el 80,18% y el 98,31% de los mayores de 35 años en Colombia, han presentado alguna enfermedad periodontal, con predominio de las forma leves.

3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MICROBIANOS:

del cultivo bacteriano a las técnicas de secuenciación.

Debido a la complejidad en la caracterización del microbioma, y a las conocidas limitaciones y sesgos que pueden presentar los métodos de detección microbiana, es poco probable que una sola técnica pueda determinar la microbiología asociada con la salud y la enfermedad (Vianna y col., 2005; Donachie y col., 2007; Teles y col., 2013). Pasar por alto los aportes históricos del cultivo y depender solo de enfoques ribosomales, al igual que desconocer que los nuevos métodos de detección microbiológica nos han permitido examinar con mayor detalle la presencia del segmento no cultivable del microbioma, podría producir lagunas significativas en los datos de diversidad microbiana (Vianna y col., 2005; Donachie y col., 2007).

Según las apreciaciones al respecto, se podría decir que serían necesarias al menos dos técnicas combinadas, donde en lo posible deberían estar el cultivo bacteriano y algún método de biología molecular, para caracterizar el microbioma de diferentes hábitats (Vianna y col., 2005; Donachie y col., 2007), y en específico, el subgingival (Teles y col., 2013).

Por lo tanto, a continuación, se describen las características de dos de los métodos de identificación de marcadores microbianos, con el objetivo de justificar su uso conjunto para proveer bases de datos microbiológicas confiables.

3.1. LA IMPORTANCIA DEL CULTIVO BACTERIANO.

Según lo propuesto por Robert Koch, el cultivo es la base de toda investigación en enfermedades infecciosas. Ha permitido la formación de bases de datos para la secuenciación del genoma de especies bacterianas, el diseño de modelos experimentales para analizar virulencia, y el estudio de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos,

constituyéndose en el primer paso para establecer recomendaciones para un tratamiento eficaz (Donachie y col., 2007).

A pesar de este valioso aporte en el conocimiento de los actores microbianos de las poblaciones del mundo, durante un período de tiempo el cultivo se abandonó gradualmente en favor de métodos moleculares. Sobre todo, debido a sus limitaciones en cuanto a las condiciones para llevarlo a cabo, y en la caracterización de especies no cultivables (Teles y col., 2013). Gran parte de la comunidad científica coincidió en el concepto de que los enfoques de cultivo detectaban solo una pequeña fracción del contenido microbiano, y en que los métodos moleculares proporcionaban una visión más completa, afirmación respaldada en el pasado por el estudio de Amann y col. de 1995.

Pero en la actualidad, ese concepto ha sido reevaluado. Estudios recientes han sugerido que entre el 45% y el 97% de los taxones del microbioma humano pueden, de hecho, cultivarse (Lloyd y col., 2018). E incluso se ha vuelto a reflexionar sobre preguntas como la de: “¿Cómo se puede construir un cuerpo de evidencia convincente para un papel causal del patógeno putativo en un proceso de enfermedad, cuando el patógeno no ha sido aislado o purificado?” (Relman, 2002).

Es así, que el cultivo se ha reinventado, y los autores se han convencido de la importancia de su uso combinado con técnicas moleculares. Las investigaciones desde hace un tiempo lo han incluido en la búsqueda de miembros de phyla específicos utilizando una especie auxiliar (Vartoukian y col., 2010; Vartoukian y col., 2016), de bases de datos para aislamientos de taxones previamente sin nombre (Dewhirst y col., 2010; Downes y col., 2013; Vartoukian y col., 2013) utilizando sideróforos (Vartoukian y col., 2016), o de aislamientos en poblaciones bacterianas mixtas cultivadas *in situ* (Sizova y col., 2012; Jung y col., 2021). Algunos estudios incluso han utilizado análisis de conglomerados para permitir el cultivo de taxones no cultivados, identificando así patobiontes que podrían actuar como especies clave, logrando cultivar por ejemplo *Tannerella* sp. HOT 286 (Duran-Pinedo y col., 2011).

En adición, se han introducido tecnologías como la Culturómica, que utiliza múltiples condiciones de cultivo, espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación del gen ARNr

16S (Lagier y col., 2018; Diakite y col., 2020). Estos métodos novedosos donde el cultivo recobra su importancia han permitido la identificación de cientos de nuevos microorganismos que brindan nuevas perspectivas sobre las relaciones entre el huésped y las bacterias, que ayudarán a diseñar estrategias de intervención para mantener la salud y atacar la enfermedad en el futuro (Kilian y col., 2016; Martellacci y col., 2019).

3.2. OBTENCIÓN DE DATOS MULTIDIMENSIONALES: *el uso de las ómicas.*

Como ya ha sido comentado, gran parte del conocimiento reciente sobre la composición del microbioma subgingival ha sido el resultado de avances en técnicas moleculares, que han permitido el análisis de alto rendimiento de un gran número de muestras. (Teles y col., 2013).

Desde hace algunos años, dentro de estas técnicas han estado los métodos de selección molecular como lo son: la hibridación de ADN-ADN en tablero de ajedrez, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), los microarrays de identificación de microbios orales humanos (HOMIM), la hibridación de ADN-ADN de oligonucleótidos y la técnica de cuantificación de ARN-oligonucleótidos (ROQT).

Aunque los métodos antes mencionados se siguen utilizando en muchos casos, cada vez más la tendencia es a emplear tecnologías basadas en la secuenciación del gen ARN ribosómico 16S (Kumar, 2020).

3.2.1. *Secuenciación del gen ARNr 16S.*

Los ribosomas son estructuras complejas que se encuentran en todas las células vivas y que funcionan en la síntesis de proteínas. Constan de dos subunidades, cada una de las cuales está compuesta por una proteína y un tipo de ARN, conocido como ARN ribosómico (ARNr). Constan de la subunidad 30S (subunidad pequeña) y de la subunidad 50S (subunidad grande) que juntas forman el ribosoma 70S completo, donde S significa unidad de Svedberg (medida de tiempo que determina la velocidad de sedimentación de una partícula cuando

se centrifuga). La subunidad 30S está compuesta por ARN ribosómico 16S y 21 cadenas de polinucleótidos, mientras que la subunidad 50S está compuesta por dos especies de ARNr, los ARNr 5S y 23S.

La secuenciación del ARN ribosómico 16S se usa ampliamente en estudios de microbiología para identificar las diversidades en organismos procarióticos, así como en otros organismos y, por lo tanto, estudiar las relaciones filogenéticas entre ellos (Cox y col., 2013).

Los métodos de secuenciación tuvieron sus inicios cuando Sanger y col. desarrollaron la técnica de dideoxi o de secuenciación de primera generación (Sanger y col., 1977). Esta técnica sufrió una modificación en la que se sumó la medición del pirofosfato durante la incorporación de desoxinucleótidos, lo que permitió analizar múltiples secuencias en paralelo y a la que se llamó: secuenciación de "segunda generación" o "pirosecuenciación". Posteriormente esta técnica evolucionó a un método en el que los desoxinucleótidos se inmovilizan en la superficie de una celda de flujo, y donde el ADN con código de barras fluye sobre ella, el cual ha sido llamado secuenciación de "próxima generación" (NGS) o "secuenciación puente". La NGS ha permitido la secuenciación masiva en paralelo de múltiples muestras, utilizando el gen ARNr 16S (Tremblay y col., 2015; Kumar, 2020).

3.2.2. EL gen ARNr 16S (Figura 3).

Pero, ¿por qué la subunidad 16S del gen del ARN ribosómico (*rrnA*), se ha convertido en la molécula ideal para ser secuenciada?. Estas son algunas de las razones (Cox y col., 2013; Kumar, 2020):

- Está presente en todos los organismos.
- El ribosoma es un orgánulo central en la función celular, asegurando que el gen se conserva.
- Las mutaciones ocurren en diferentes partes del gen a diferentes velocidades, lo que permite calcular distancias filogenéticas con precisión.
- Son genes de gran tamaño (~ 1600 pares de bases).

- Hay menos estructuras secundarias (alrededor de 45 bucles helicoidales) en el ARN, lo que facilita la secuenciación.
- Hay franjas de secuencias de genes que se conservan, lo que facilita el diseño de cebadores universales, mientras que las nueve Regiones Hipervariables (V1 a V9) permiten la discriminación entre diferentes microorganismos, por lo que proporcionan una secuencia específica de especie que es útil para el proceso de identificación bacteriana. Estas secuencias son de bases específicas que siempre se encuentran en todos los grupos de organismos, tienen alrededor de 5 a 10 bases, se encuentran específicamente en la ubicación del ARNr 16S, y son exclusivas de muchos grupos importantes de organismos procariontas, Arqueas y Eukarya.

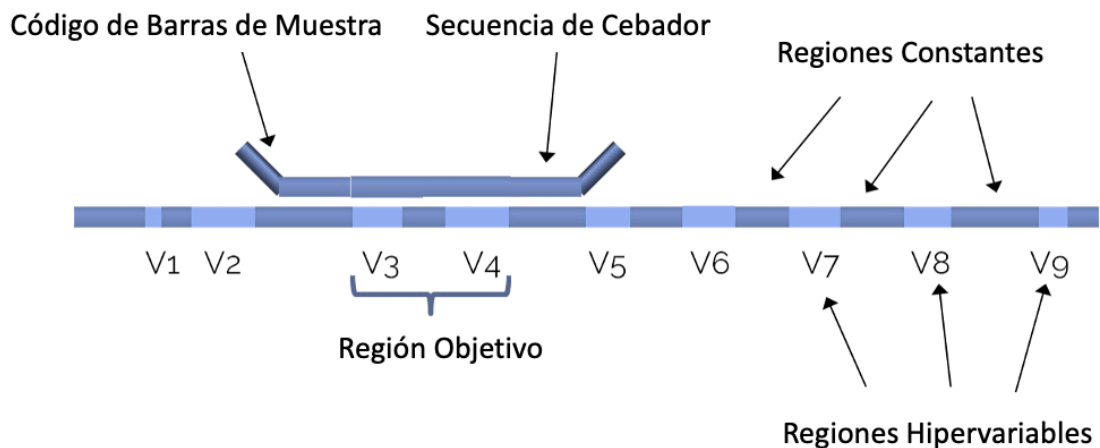


Figura 3. Gen ARNr 16S. Código de barras de muestras de ADN, Secuencia de cebadores universales, Regiones constantes y variables y la posible región objetivo que sería secuenciada.

3.2.3. Secuenciación del gen ARNr 16S con la metodología Illumina.

Una de las metodologías para la secuenciación del gen ARNr 16S es Illumina.

Esta tecnología se caracteriza por llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de ADN para formar clústers (colonias del mismo fragmento), utilizando el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en puente. Además, la detección de bases de nucleótidos en la secuenciación se hace utilizando etiquetas/terminadores fluorescentes (Morozova y col., 2008; Stark y col., 2019).

El protocolo de secuenciación es el siguiente:

- a) Se produce la ruptura del ADN en fragmentos, con alrededor de 200 a 600 pares de bases.
- b) Las secuencias cortas de ADN llamadas adaptadores (molécula de ADN bicatenaria corta, sintetizada químicamente, que se utiliza para unir otras dos moléculas de ADN), se unen a los fragmentos de ADN.
- c) Los fragmentos de ADN unidos a los adaptadores se fabrican incubando los fragmentos con hidróxido de sodio.
- d) Una vez preparados, los fragmentos de ADN se lavan a través de celda de flujo. El ADN complementario se une a los cebadores seleccionados (hebra corta de ARN que actúa como punto de partida para la replicación del ADN) en la superficie de la celda de flujo, y el ADN que no se adhiere se elimina por lavado.
- e) El ADN unido a la celda de flujo se replica luego para formar pequeños grupos de ADN con la misma secuencia. Cuando se secuencia, cada grupo de moléculas de ADN emitirá una señal que es lo suficientemente fuerte como para ser detectada por una cámara.
- f) Se agregan nucleótidos sin marcar y ADN polimerasa (enzima involucrada en la producción de nuevas moléculas de ADN a partir de las cuatro bases de nucleótidos, utilizando el ADN existente como plantilla), para alargar y unir las hebras de ADN adheridas a la celda de flujo. Esto crea "puentes" de ADN de doble hebra entre los cebadores en la superficie de la celda de flujo.

- g) Luego, el ADN de doble hebra se descompone en ADN de hebra sencilla usando calor, dejando varios millones de densos grupos de secuencias de ADN idénticas.
- h) Posteriormente a la celda de flujo se agregan primers y los terminadores fluorescentes (nucleótidos fluorescentes que actúan como "terminadores de cadena", que detienen la síntesis de ADN).
- i) El cebador se adhiere al ADN que se está secuenciando.
- j) La ADN polimerasa luego se une al cebador y agrega el primer terminador marcado con fluorescencia a la nueva cadena de ADN.
- k) Los láseres se pasan sobre la celda de flujo para activar la etiqueta fluorescente en las bases de nucleótidos. Esta fluorescencia es detectada por una cámara y registrada en una computadora. Cada una de las bases nitrogenadas del terminador (A, C, G y T) emite un color diferente.
- l) A continuación, el grupo terminador marcado con fluorescencia se elimina de la primera base, y se puede añadir al lado de la siguiente base del terminador, marcada con fluorescencia. De esta manera el proceso continúa hasta que se hayan secuenciado millones de clústeres.

La secuencia de ADN se analiza base por base durante la secuenciación de Illumina, lo que lo convierte en un método muy preciso (Morozova y col., 2008; Stark y col., 2019).

3.2.4. Análisis de los datos de Secuenciación.

El análisis de los datos del ARNr 16S se basa en la agrupación de secuencias relacionadas en un nivel particular de identidad, donde se cuenta el número de representantes de cada agrupación, por lo que constituye una fuente rica de información. Este proceso de análisis de datos se lleva a cabo en tres fases:

Primera Fase – Procesamiento y Filtrado de los Datos Primarios:

Esta primera fase consiste en evaluar la calidad y longitud de la lectura, y las quimeras (productos híbridos entre múltiples secuencias parentales que pueden interpretarse

falsamente como organismos nuevos, lo que aumenta la diversidad aparente) (Haas y col., 2011; Weinstock y col., 2012).

Segunda Fase – Generación de Conjuntos de Datos:

Para minimizar los riesgos de error del secuenciador en la secuenciación dirigida, se desarrollaron inicialmente sistemas de agrupamiento. Estos sistemas se basan en la idea de que los organismos relacionados/similares tendrán secuencias de genes diana parecidos. (Blaxter y col., 2005; Li y col., 2006).

Estos grupos de secuencias/genomas similares son las OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) o filotipos. Los grupos se resumen en una tabla de taxones y abundancias relativas (uniformidad) para cada organismo en cada muestra, como resultado de comparaciones con bases de datos de secuencias, o mediante el uso de softwares (Weinstock y col., 2012). La comparación de las lecturas/secuencias con las secuencias de las bases de datos de genes, se realiza mediante el uso de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Weinstock y col., 2012). Algunas de las bases de datos de referencia elegida, donde las secuencias se someten a una evaluación de la calidad son: HOMD (<http://www.homd.org/>), GenBank (la base de datos de secuencias de los National Institutes of Health (NIH)), The Ribosomal Database Project (RDP), GreenGenes y SILVA (<http://www.arb-silva.de>). Otras herramientas informáticas utilizadas son los canales de análisis MOTHUR y QIIME 2, o el ensamblador EMIRGE 16S, que se desarrollaron para analizar lecturas únicas, genes de ARNr 16S ensamblados de extremos emparejados o ensamblados de longitud completa (Kumar y col., 2020).

Cuando se utilizan secuencias de genes de ARNr 16S parciales, con frecuencia se elige un nivel de identidad de secuencia del 97% como representativo de una especie y del 95% para un género (Cox y col., 2013). Se supone que las diferencias de secuencia se deben a variaciones dentro del grupo taxonómico o al ruido aleatorio del secuenciador. Todas las lecturas de secuencia dentro del radio elegido se agrupan en una sola OTU, que representa una unidad de análisis (Callahan y col., 2019).

Este enfoque conlleva el riesgo de que múltiples especies similares se puedan agrupar en una única OTU, y sus identificaciones individuales se pierdan en el resumen de un grupo

(Kunin y col., 2010). Para solucionar estas limitaciones, recientemente se ha introducido el enfoque de Variante de Secuencia de Amplicón (ASV) (Callahan y col., 2019). Mientras que los enfoques de agrupación de OTU intentan difuminar secuencias similares minimizando así la influencia de cualquier error de secuenciación dentro del grupo de lecturas, el enfoque de Variante de Secuencia de Amplicón (ASV) intenta ir en la dirección opuesta.

ASV:

La ASV comienza determinando qué secuencias exactas se leyeron y cuántas veces se leyó cada secuencia exacta. Estos datos se combinan con un modelo de error para la ejecución de secuenciación, lo que permite la comparación de lecturas similares para determinar la probabilidad de que una lectura dada a una frecuencia determinada, no se deba a un error del secuenciador. Esto crea, en esencia, un valor p para cada secuencia exacta, donde la hipótesis nula es equivalente a que esa secuencia exacta sea una consecuencia del error de secuenciación (Callahan y col., 2019). Debido a que se trata de secuencias exactas, generadas sin agrupaciones o bases de datos de referencia, los resultados de ASV se pueden comparar fácilmente entre estudios que utilizan la misma región objetivo (Callahan y col., 2019). Al considerar tanto la similitud de secuencia como la abundancia en el modelo, los métodos ASV tienen en cuenta el perfil de error que resulta de los experimentos de secuenciación de próxima generación (NGS), que pueden producir decenas de miles de lecturas para una única secuencia de plantilla del gen de ARNr 16S. Por lo tanto, los métodos ASV tienen el potencial de mejorar simultáneamente la sensibilidad y la especificidad de la inferencia de la secuencia del gen 16S rRNA en comparación con los métodos con OTU (Caruso y col., 2019).

Tercera Fase – Utilización de los Datos:

Los datos obtenidos se emplean en producir entre otras, curvas de abundancia, diversidad taxonómica y otros descriptores ecológicos y estadísticos de la estructura de la comunidad. La diversidad, entendida como la estadística resumida de la estructura de la comunidad, o como la suma de la riqueza (número de OTUs) y de la uniformidad (abundancia relativa de cada OTU), puede estar representada como diversidad alfa (dentro de la diversidad de la muestra (intra muestra) - número de filotipos en una muestra) y/o diversidad beta

(diversidad entre muestras - permite conocer las diferencias entre dos comunidades dadas). En específico la diversidad puede ser medida por los índices de Riqueza (número total de especies), de Shannon (índice de diversidad común que cuantifica la incertidumbre de predecir el próximo individuo tomado de una muestra - incorpora tanto la riqueza como la uniformidad en un solo valor) (Tabla 3) y de Simpson (índice de diversidad común que indica la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una población sean iguales - el aumento de la diversidad se refleja en un valor de índice creciente). (Cox y col., 2013) (Tabla 3).

Tabla 3. Interpretación de los Índices de Shannon y de Simpson.

	Valores	Interpretación
Shannon	0,1 - 1,5	Diversidad baja
	1,6 - 3,0	Diversidad media
	3,1 - 4,5	Diversidad alta
	Valores	Interpretación
Simpson	0,00 - 0,5	Diversidad baja
	0,36 - 0,75	Diversidad media
	0,76 - 1,00	Diversidad alta

Según lo revisado, los dos métodos descritos (cultivo y secuenciación del gen ARNr 16S), han contribuido a la información microbiológica periodontal que se conoce hasta hoy, y que se describe a continuación.

4. MARCADORES MICROBIANOS EN LAS POBLACIONES:

de la salud a la enfermedad.

Los seres humanos, como todos los eucariotas multicelulares complejos, no son organismos autónomos, si no unidades biológicas que incluyen numerosos simbioses microbianos y sus genomas (microorganismos que viven en simbiosis con el huésped) (Bordenstein y col., 2015). El humano junto con sus residentes microbianos forman un 'superorganismo' u holobionte donde ambos co-evolucionan en respuesta al medio ambiente y entre sí. La comunidad de residentes microbianos se conoce como Microbioma, descrito como “la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos, que literalmente comparten el espacio corporal y han sido casi ignorados como determinantes de la salud y de la enfermedad” (Kilian y col., 2016). La relación entre el microbioma y el huésped es dinámica y está influenciada por muchos aspectos, como la genética, la etnia de las poblaciones, y factores ambientales, que tienen la capacidad ya sea de mantener o alterar los estados de equilibrio en el hábitat en el que se desarrollan (Mason y col, 2013; Gomez y col, 2017).

El enfoque entonces no debe ser en el huésped y sus residentes como unidades separadas, sino que debe considerarse al holobionte (Kilian y col., 2016). A este respecto, las comunidades microbianas subgingivales, desempeñan un papel fundamental en el estado de equilibrio del holobionte, debido a que la naturaleza de los estímulos microbianos periodontales, son un factor determinante en las respuestas protectoras o patógenas del huésped. Por lo tanto, es importante comprender los cambios en la composición del microbioma que están asociados con cada estado periodontal (Abusleme y col., 2021).

4.1. MICROBIOMA SUBGINGIVAL.

Las comunidades microbianas periodontales son complejas y albergan microorganismos de los tres dominios de la vida: bacterias (bacterioma) (Ng y col., 2021), eucariotas

(eucarioma), arqueas y virus (viroma), que pueden llegar a tener interacciones o roles importantes dentro del microbioma (Abusleme y col., 2021). Los microorganismos (la microbiota) que componen el microbioma humano no son solo organismos unicelulares que viven uno al lado del otro, sino que forman comunidades altamente reguladas, organizadas estructural y funcionalmente unidas a las superficies como biopelículas con colaboraciones entre especies, así como antagonismos que contribuyen a la estabilidad ecológica (Kilian y col., 2016).

Las bacterias son el componente más numeroso y diverso del microbioma subgingival, de las cuales hasta la fecha se han detectado alrededor de 700 especies diferentes (Kilian y col., 2016). Aproximadamente el 57% tiene nombre oficial, el 13% no tiene nombre pero se cultiva y el 30% se conocen solo como filotipos no cultivados (HOMD, 2021).

4.1.1. Integrantes cultivables, no cultivables y difícilmente cultivables del Microbioma

Subgingival.

Luego del consenso periodontal de 1996 (AAP, 1996) se determinaron como periodontopatógenos o patógenos fuertemente asociados con la periodontitis a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*, seguidos de *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Parvimonas micra* y *Treponema denticola*.

En la actualidad el término “Patógeno Clave”, se ha descrito como la especie que tiene una influencia exageradamente grande en el ecosistema, que no es proporcional a su abundancia en la comunidad microbiana (Hajishengallis y col., 2016). Además de los patógenos clave, al resto de miembros de la comunidad microbiana residente que son capaces de causar enfermedades en determinadas circunstancias, se les ha dado el nombre de “Patobiontes” (Chow y col., 2010).

A partir del Human Microbiome Project Consortium de 2012, se estableció que existen varios cientos de especies distintas (muchas de ellas aún sin asignación) representando las muy diversas comunidades microbianas de la boca (Hong y col., 2015; Mira y col., 2017),

con la posibilidad de presentarse de manera heterogénea, entre distintas poblaciones con características demográficas diferentes (Mira y col., 2017), afectando la salud general (Kumar, 2017).

Entre estas especies estarían algunos representantes de los géneros *Filifactor*, *Desulfobulbus*, *Eubacterium*, los cuales han cobrado importancia, debido a que han cambiando el paradigma de la etiología de las enfermedades periodontales (Wade, 2013; Wang y col., 2013; Deng y col., 2017).

Uno de los patobiontes que se ha encontrado con una fuerte asociación con el desarrollo y progresión de la periodontitis es el perteneciente al género *Filifactor*, *F. alocis*, aislado por primera vez en 1.985 (Aruni y col., 2015). Es un bacilo anaerobio gram-positivo, asacarolítico, con la capacidad de utilizar arginina como aminoácido específico, lo que estimula su crecimiento. Este microorganismo se ha encontrado en el surco gingival y ha sido difícil de identificar por pruebas bioquímicas, por lo cual nuevas tecnologías como la secuenciación de última generación han sido herramientas importantes que han permitido caracterizarlo mejor. Inicialmente fue clasificado como *Fusobacterium alocis* debido a la estrecha relación que se ha encontrado con el género *Fusobacterium*. Actualmente se ha explorado en diversos estudios la importancia de este microorganismo al encontrarlo principalmente en pacientes con periodontitis y estar ausente en personas sanas, por lo cual se ha propuesto como un marcador de la enfermedad (Colombo y col, 2009; Kumar y col, 2005). *F. alocis* presenta diferentes factores de virulencia y propiedades que le confieren resistencia a situaciones adversas, como al estrés oxidativo (Aruni y col., 2011), lo cual le permite colonizar y sobrevivir con otros microorganismos descritos como patógenos clave periodontales. Se ha observado también que es un microorganismo con la capacidad de estimular la producción de citocinas proinflamatorias, lo que se ha relacionado con provocar procesos apoptóticos en células epiteliales gingivales (Moffatt y col., 2011). Se ha documentado igualmente la presencia de alrededor de 15 proteasas presentes en esta bacteria, las cuales podrían funcionalmente ser similares a la de los patógenos periodontales reconocidos, ya que algunas de estas enzimas se considera que producen o inducen colagenasas, las cuales se han implicado con destrucción periodontal

(Citron, 2002). También se ha observado que la coinfección con *P. gingivalis* puede favorecer el potencial patogénico de *F. alocis*, principalmente en relación con la expresión diferencial de varios factores de virulencia (Aruni y col., 2011).

Del género *Desulfobulbus*, la cepa *Desulfobulbus* sp. cepa HMT 041 (*Deltaproteobacteria*) (*Desulfobulbus oralis*), es un bacilo gram-negativo, anaerobio, deltaproteobacteria reductora de sulfato, inmóvil y no esporulado de 1 a 2µm de longitud y 0,3µm de diámetro. Se ha adaptado al nicho subgingival oral, está fuertemente asociado con periodontitis severas, y es el primer representante de su género asociado con colonización en humanos. Esta facilidad de colonizar la ha adquirido mediante la reducción de su repertorio fisiológico, la pérdida de algunas capacidades biosintéticas y la independencia metabólica, y al reducir drásticamente las capacidades de detección y señalización ambiental. Los genes que permiten que el *Desulfobulbus* de vida libre sintetice la neurotoxina potente metilmercurio (Cross y col., 2018).

El género *Eubacterium* se ha asociado desde hace varios años con periodontitis, aunque habían sido difíciles de estudiar debido a su crecimiento lento y exigente (Wade, 1996). Uno de sus representantes es *Eubacterium brachy*. Estos microorganismos descritos como bacilos gram-positivos, anaerobios, asacarolíticos, se han aislado como bacterias predominantes de bolsas periodontales y se han encontrado distribuidos frecuentemente en pacientes con periodontitis a diferencia de pacientes sanos (Haffajee y col., 2006). Estudios han sugerido una asociación importante con la enfermedad periodontal al encontrar altos niveles de anticuerpos séricos contra *E. saphenum* en modelos de ratón, asociados a periodontitis, concluyendo que la respuesta podría ser similar a la generada por *P. gingivalis* (Salam y col., 2001).

4.1.2. El Microbioma Subgingival en diferentes condiciones periodontales y poblaciones.

El conocimiento sobre el microbioma subgingival en diversas poblaciones es limitado (Herrera y col., 2008), y ha surgido, en su mayoría, empleando métodos dispares de

detección de especies bacterianas (Contreras y col., 2015; Montenegro y col., 2020), como ya se ha expuesto anteriormente.

Hasta donde se tiene conocimiento, la mayor parte de la información disponible sobre el tema se ha obtenido de Europa (Szafranski y col., 2015; Schulz y col., 2019; López y col., 2020; Lenartova y col., 2021), Asia (Wang y col., 2013; Li y col., 2014; Li y col., 2015; Shi y col., 2018; Wei y col., 2019; Ikeda y col., 2020; Izaway col., 2021) y América del Norte (Kumar y col., 2005; Griffen y col., 2012; Liu y col., 2012; Kirst y col., 2015; Chen y col., 2018 a; Chen y col., 2018 b).

Pocos son los estudios que se han llevado a cabo en países en vías de desarrollo (Gjerme y col., 2002; Gajardo y col., 2005; Lafaurie y col., 2007; Haubek y col., 2008; Abusleme y col., 2013; Pérez-Chaparro y col., 2018; Collins y col., 2019), y aún menos son los estudios que han comparado los perfiles microbianos entre países (Cao y col., 1990; Ali y col., 1994; Sanz y col., 2000; Fabris y col., 2002; Haffajee y col., 2004; Lopez y col., 2004; Herrera y col., 2008).

A pesar de la poca y variable información al respecto, la evidencia científica sobre este tema ha coincidido en que las diferentes especies bacterianas, pueden variar entre grupos geográficos o étnicos, lo que impactaría en el diagnóstico de los estados periodontales en general, y en el desarrollo y tratamiento de la gingivitis y la periodontitis (Umeda y col., 1998; Gjerme y col., 2002; Haffajee y col., 2004; Herrera y col., 2008, Mason y col., 2013).

Especies asociadas a Salud, Gingivitis y Periodontitis.

Con el paso de los años y según el Proyecto Microbioma Humano (Ding y col., 2014) se destacó la importancia de reconocer un microbioma común en salud para toda la población mundial, y así comprender la susceptibilidad a las enfermedades.

Los estudios que se dieron a la tarea de determinar estos datos concluyeron que al evaluar el microbioma periodontal de cuatro grupos poblacionales distintos (negros no hispanos, blancos no hispanos, chinos y latinos), diferentes linajes bacterianos contribuyeron a la composición de las comunidades subgingivales en salud de las diferentes etnias (Mason y

col., 2013). Los blancos no hispanos mostraron menor diversidad bacteriana en comparación con los otros tres grupos étnicos, lo que podría indicar que los afroamericanos tienen menos especies subgingivales, y que algunas de estas especies son miembros numéricamente dominantes de la comunidad en comparación con las otras etnias (Mason y col., 2013). Estos linajes podrían estar representados por especies reportadas en estudios clásicos mundiales con el uso de cultivo bacteriano, como: *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces* spp., *Actinomyces meyeri* y *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus gordonii*, *Peptostreptococcus micros*, *Gemella morbillorum*, *Veillonella parvula*, *Veillonella typica*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*, y *Fusobacterium nucleatum* (Moore y Moore, 1994), y por las detectadas con el uso de nueva tecnología de secuenciación del gen de ARNr 16S como: *Lautropia mirabilis*, *Corynebacterium durum*, *Corynebacterium matruchotii*, *Granulicatella* spp. (Mark Welch y col., 2016; Lourenço y col., 2014; Izawa y col., 2020), *Rothia* spp., *Corynebacterium* spp., *Lautropia mirabilis*, *Neisseria flava*, *Bergeyella* spp. y *Kingella oralis*, además de anaerobios facultativos entre los que estuvieron: *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Gemella* spp. y *Capnocytophaga* spp. Esto se relaciona según estudios, con los altos niveles de oxígeno a los que están expuestas las comunidades asociadas con la salud (Tanaka, y col., 1998). También se ha demostrado que *Rothia* spp. participa en interacciones de coagregación célula-célula en biopelículas tempranas (Palmer y col., 2017), y que *Corynebacterium* spp., sirve como un elemento clave de formación en un consorcio microbiano organizado espacialmente, que se observa durante la formación temprana de biopelículas (Mark Welch y col., 2016). Por lo tanto, las especies asociadas con la salud, parecen ser especies con roles demostrados durante la colonización temprana. Esto es consistente con la idea de que se mantiene un estado saludable mediante la eliminación frecuente de biopelículas orales (Curtis y col., 2020; Abusleme y col., 2021).

A diferencia de la salud, las comunidades en gingivitis están compuestas principalmente por especies anaerobias gram-negativas (observadas por cultivo) (Moore y Moore, 1994), aunque mediante secuenciación se ha detectado que los consumidores de oxígeno, como

Neisseria spp. y *Streptococcus* spp., también están presentes. Esto está relacionado con la formación de un nuevo nicho en la gingivitis que incentiva el crecimiento de anaerobios sensibles al oxígeno. *Leptotrichia* spp., *Prevotella* spp. y *Selomomonas* spp. (Kistler y col., 2013; Lourenço y col., 2014), también parecen ser algunos de los miembros más abundantes de la comunidad (Park y col., 2015). Como la gingivitis se asocia a un aumento de la carga microbiana total, esto implica un cambio en estas especies gram-negativas que es incluso mayor a su aumento proporcional, además de que se han observado cambios en la abundancia de diferentes especies de *Fusobacterium* y subespecies de *F. nucleatum* de la salud a la gingivitis (Kistler y col., 2013; Lourenço y col., 2014; Schincaglia y col., 2017; Abusleme y col., 2021).

Durante la periodontitis, las comunidades bacterianas exhiben un cambio profundo caracterizado por el aumento de especies anaerobias en su mayoría gram-negativas. Este cambio es distinto al de la salud a la gingivitis y, en su mayor parte, las especies aumentadas en periodontitis en comparación con la salud o con gingivitis, son congruentes (Abusleme y col., 2021). Varias especies que se han asociado clásicamente con periodontitis están constantemente sobrerrepresentadas, como es el caso de *P. gingivalis*, *F. alocis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola* y *P. micra*, entre otras. Las especies no cultivables aumentadas en periodontitis en comparación con la salud y la gingivitis incluyen *Treponema* sp HMT 237, *Fretibacterium* sp. HMT 360, *Fretibacterium* sp. HMT 361, *Desulfobulbus* sp. HOT 041 y *Saccharibacteria* (TM7) [G1] HMT (Curtis y col., 2020; Abusleme y col., 2021). Estos resultados muestran que, durante la periodontitis, la carga microbiana asociada con las lesiones establecidas es dramáticamente distinta de la asociada con la gingivitis (Abusleme y col., 2021). También se ha observado una mayor abundancia de *Fusobacterium* spp. durante la periodontitis en relación con la abundancia en salud y gingivitis. Ciertas *Fusobacterium* spp. fueron previamente identificadas como especies centrales (es decir, especies cuya proporción no cambia de salud a enfermedad) (Abusleme y col., 2013; Hong y col., 2015). Por lo tanto, estos resultados aún apoyan el concepto de que *F. nucleatum* es un componente importante de la placa dental subgingival, posiblemente sirviendo como un ancla metabólica para otros miembros de la comunidad (Abusleme y col., 2021).

En cuando a la etnia, empleando diferentes métodos de detección microbiológica, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* se han encontrado mayormente en pacientes caucásicos, al ser comparados con sujetos de otras poblaciones (Ali y col., 1994; Herrera y col., 2008). *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* han sido altamente asociadas a los afroamericanos (Cortelli y col., 2009) y africanos con periodontitis (Chahboun y col., 2015). Los sujetos asiáticos tienen tendencia a una mayor detección de uno o varios patobiontes periodontales como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* y/o *T. denticola*, según lo confirma un estudio reciente realizado en pacientes japoneses (Li y col., 2015), donde se detectó una alta abundancia relativa de *P. gingivalis* (aproximadamente 35,88%) en el microbioma subgingival de pacientes con periodontitis.

Específicamente en el caso de Latinoamérica (Contreras y col., 2015), se han reportado niveles elevados de colonizadores primarios (*Staphylococcus aureus*) (Loberto y col., 2004), de especies puente (*Fusobacterium* spp.) (Victor y col., 2008), y de colonizadores tardíos (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*) (Gajardo y col., 2005), en sujetos con periodontitis. En específico, Brasil ha evidenciado una alta detección de *A. actinomycetemcomitans* no leucotóxico (Vieira y col., 2009) y de cepas altamente leucotóxicas (clon JP2) (Cortelli y col., 2005) prevalentes en ascendentes africanos (Chahboun y col., 2015), lo que explicaría su presentación en pacientes afrodesendientes, como es en gran medida la población brasileña (Cortelli y col., 2009) y de algunas otras zonas de Latinoamérica. En adición, otros estudios han aportado una larga lista de especies prevalentes en las periodontitis de Brasil, entre las que se han encontrado: *Campylobacter* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *P. micra*, *Prevotella* spp., *Selenomonas* spp., *Actinobaculum* spp., *Alloprevotella tanneriae*, *Anaeroglobus geminatus*, *Bacteroidales* spp., *Catonella morbi*, *Desulfobulbus* sp., *Dialister* spp., *Filifactor alocis*, *Fretibacterium* spp., *Peptostreptococcus stomatis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Solobacterium moorei* y *TM7* spp. (Lourenço y col., 2014). Por su parte, en los estudios realizados en pacientes chilenos con periodontitis, se ha observado prevalencia de *Espiroquetas*, *Sinergistetes*, *Firmicutes* y *Cloroflexi* (Abusleme y col., 2013), y en específico niveles variables de *C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. micra* y *Treponema socranskii* (Lopez y col., 2004), alta prevalencia de *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *P. micra* y

Capnocytophaga spp. (Gajardo y col., 2005), y menos frecuencia de *T. forsythia*, *P. intermedia* y *Capnocytophaga* spp., al compararlos con pacientes colombianos y españoles (Herrera y col., 2008). México, comparte la tendencia latinoamericana de presentar una alta detección de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* (Ximenez-Fyvie y col., 2006), además de *P. intermedia* en los pacientes con periodontitis. Argentina (Canigia y col., 1999), Guatemala (Pomes y col., 2000) y Panamá (Eisenmann y col., 1983), reportaron alta detección de *A. actinomycetemcomitans*, y estudios en República Dominicana evidenciaron prevalencia de *P. intermedia* y *P. gingivalis* (Collins y col., 2019), además de bacilos entéricos gram-negativos en sitios periodontales no tratados (Slots y col., 1991).

Especies asociadas a Periodontitis en Salud y Gingivitis.

Todas las especies asociadas a periodontitis se han podido detectar en gingivitis y la mayoría también se han detectado en salud. Sin embargo, su frecuencia de detección en salud al parecer es mucho menor que su frecuencia de detección en gingivitis. Las especies asociadas a periodontitis con menor frecuencia de detección en salud fueron *Fretibacterium* spp. HMT 361 (no detectada en salud) y *P. gingivalis* (muy poco detectada). En particular, ambas especies se pueden convertir en unos de los miembros más abundantes y detectados de las comunidades de periodontitis. Vale la pena señalar que un subconjunto de especies que se detectaron con frecuencia en la periodontitis también tuvieron una alta prevalencia tanto en la salud como en la gingivitis. Entre ellas se encuentran *Campylobacter gracilis* y varias subespecies de *F. nucleatum* (*vincentii* y *animalis*). En general, se podría decir que las especies asociadas a la periodontitis son autóctonas y forman parte de comunidades asociadas a la salud, y aumentan a medida que el entorno cambia durante la inflamación. Además, las comunidades de gingivitis pueden presentar niveles aumentados (por lo tanto, mayor detección) de aquellas especies que finalmente dominan las comunidades disbióticas asociadas con la periodontitis. Sin embargo, parece haber diferencias en el nivel de transformación de las especies desde estados sanos a estados inflamatorios, con

Fretibacterium sp. HMT 361 y *P. gingivalis* que muestran el aumento más drástico en los niveles de detección durante la inflamación (Abusleme y col., 2021).

Cambios subgingivales de microbiomas en Salud, Gingivitis y Periodontitis.

Al parecer cada estado periodontal tiene comunidades microbianas distintas, pero evidencian un grupo común de especies centrales o “Core Species” (Abusleme y col., 2013; Curtis y col., 2020). De este grupo, *Veillonella parvula*, *Veillonella dispar*, *Campylobacter gracilis* y *Prevotella oris* estuvieron presentes en una abundancia relativa similar cuando se comparó la salud con la gingivitis, y la gingivitis con la periodontitis. Se ha demostrado que varias especies centrales que no difieren en proporción entre la salud y la gingivitis son mediadores importantes de la formación de placa, ayudando en el establecimiento de especies asociadas con periodontitis de colonización tardía. Por ejemplo, se ha demostrado que *Streptococcus gordonii* facilita la acumulación en biopelículas de *P. gingivalis* asociada a periodontitis (Kuboniwa y col., 2017).

Estos estudios apoyan el concepto de que las especies centrales, que aumentan en biomasa a medida que las comunidades microbianas subgingivales pasan de un estado a otro, pero no cambian en proporción, actúan como facilitadores de la disbiosis (Abusleme y col., 2021).

4.1.3. El Microbioma Subgingival en España y Colombia

España.

En el microbioma periodontal de los pacientes españoles sin periodontitis, se ha evidenciado la detección de *Actinobacteria*, *Actinomyces* y *Rothia* (López-Martínez y col., 2020).

Por otro lado, la microbiota subgingival de pacientes españoles con periodontitis identificada mediante cultivo bacteriano, estaría caracterizada por una baja prevalencia de *A. actinomycetemcomitans*, y alta detección de *P. gingivalis* (Sanz y col., 2000; Herrera y

col., 2008) y de *F. nucleatum* (Herrera y col., 2008), al compararla con la de diferentes poblaciones tanto europeas (Sanz y col., 2000), como Latinoamericanas (Herrera y col., 2008). Igualmente, en investigaciones realizadas con RH-PCR, *T. forsythia* se asoció con mayor gravedad de la periodontitis en España, junto con *T. denticola* (Lanza y col., 2016). A su vez, estudios llevados a cabo con secuenciación del gen ARNr 16S, reportaron que los phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* y *Synergistetes*, y los géneros *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella* y *Treponema*, estaban altamente asociados con la periodontitis (López-Martínez y col., 2020). Además, el análisis ecológico mostró una mayor abundancia de especies, y una alta diversidad alfa promedio (dentro de cada localización), en la periodontitis de los españoles (López-Martínez y col., 2020).

Colombia.

A través del tiempo, se han llevado a cabo algunos estudios que han intentado caracterizar la microbiota subgingival en Colombia (Contreras y col., 2015), donde se han identificado la prevalencia de bacilos entéricos de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (Lafaurie y col., 2007; Mayorga-Fayad y col., 2007), además de altos niveles de *C. rectus* en los pacientes sin periodontitis (Mayorga-Fayad y col., 2007).

Investigaciones llevadas a cabo por cultivo (Mayorga-Fayad y col., 2007), o por combinación de cultivo y PCR (Botero y col., 2007; Lafaurie y col., 2007), en su mayoría han detectado *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *Fusobacterium* spp., además de una alta frecuencia de bacilos entéricos gram-negativos (al igual que los pacientes sin periodontitis), y una prevalencia relativamente baja de *A. actinomycetemcomitans*, en pacientes con periodontitis (Botero y col., 2007; Mayorga-Fayad y col., 2007; Lafaurie y col., 2007). En contraste con estos resultados, un estudio longitudinal de periodontitis no tratada evidenció presencia inconstante de bacilos entéricos gram-negativos en algunos de los pacientes objeto de investigación, a lo largo de un período de seguimiento de un mes. Por tanto, se podría plantear la hipótesis de que los

bacilos entéricos gram-negativos son microorganismos transitorios en localizaciones subgingivales de los pacientes colombianos (Martinez-Pabon y col., 2010). El único estudio a día de hoy, donde se ha comparado la microbiota periodontal colombiana con las de otras poblaciones, ha sido el de Herrera y colaboradores en 2008. Los autores caracterizaron por cultivo bacteriano la microbiota de pacientes con periodontitis crónica en Colombia, Chile y España. Los pacientes de Colombia revelaron una mayor gravedad de la periodontitis, recuentos de colonias bacterianas totales significativamente más altas, y mayores niveles de *T. forsythia* y una vez más de bacilos entéricos gram-negativos, sumado a bajos niveles de *A. actinomycetemcomitans*. Los bajos niveles de *A. actinomycetemcomitans* se creyó que podrían reforzar la hipótesis de que este patobionte conocido, no es la especie más prevalente en la periodontitis de los pacientes colombianos (Lafaurie y col., 2007; Botero y col., 2007).

Este microbioma subgingival puede afectar la salud periodontal positiva (eubiosis), o negativamente (disbiosis) (Kumar, 2021). Los efectos pueden ir desde mantener un ecosistema donde sus integrantes vivan en armonía mutua, hasta uno en desequilibrio con agotamiento de la capacidad de resiliencia bacteriana, razón por la cual incluso podría verse comprometida la vida del individuo afectado (huésped) (Kumar, 2021).

4.1.4. Influencia del Microbioma Subgingival en la Salud y en la Enfermedad Periodontal.

Eubiosis.

La eubiosis como punto de partida para entender la disbiosis, es un estado de homeostasis o de equilibrio entre la comunidad residente, y el organismo que la alberga (huésped). Todo esto depende de la biología del ecosistema, entendiendo por ecosistema “una comunidad biológica de organismos que interactúan, y su entorno físico” (Kumar, 2021). Pertenecer a un ecosistema eubiótico depende de las limitaciones físicas del hábitat, de la disponibilidad nutricional, funcional y de las necesidades metabólicas, además de la presencia de microorganismos preexistentes o antagonistas, entre otras (Barraclough, 2015).

Los organismos que son aptos para este entorno, son los que poseen la capacidad no sólo de sobrevivir, sino que también contribuyen de manera significativa al sistema en el que viven (Peacock, 2011), manteniendo estrictas reglas de coexistencia y limitado éxito individual (equilibrio de Nash) (Holt y col., 2004). Es así que los organismos exógenos que no se ajustan a estas reglas de coexistencia, están en desventaja durante la colonización, mientras que los límites al éxito individual, evitan que las especies residentes individuales (patógenos clave periodontales) se apoderen del ecosistema (Kamada y col., 2013; Kumar, 2021).

Disbiosis.

Contrario a la eubiosis, la disbiosis se define como pérdida de la homeostasis/equilibrio, o como un cambio en la comunidad que es perjudicial para la salud humana (Petersen y col., 2014). En las enfermedades periodontales, podría manifestarse con disminución de la diversidad, con expansión de patobiontes y pérdida de especies clave, o con disminución de especies beneficiosas (Levy y col., 2017), entre otras, con la consecuente destrucción de los tejidos de soporte de los dientes. (Kumar, 2021).

Disminución de la diversidad.

La salud está asociada con un microbioma diverso que aporta beneficios al holobionte, y la disbiosis está asociada con una pérdida de diversidad taxonómica que puede perjudicar la salud (Kumar, 2021). El paso de la eubiosis a la disbiosis sigue los principios de la sucesión ecológica primaria, con cambios en las abundancias relativas del microbioma, en lugar de reemplazar las especies existentes por otras nuevas y exógenas (Abusleme y col., 2013). Sin embargo, esto no siempre sucede para todos los casos de periodontitis, pudiendo incluso ser distinto según la población en la que se presenta. Por lo tanto, la disminución o aumento de la diversidad, podría verse influenciada por ciertas presiones ecológicas y ambientales, o incluso por condiciones propias del huésped (Kumar, 2021).

Expansión de patobiontes y pérdida de especies clave.

El modelo reciente del "Patógeno clave" o de Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis (PSD) como la causa en el desarrollo de la periodontitis, le da gran protagonismo específicamente a *P. gingivalis* (Hajishengallis y col., 2012). Según esta hipótesis, *P. gingivalis* modula el sistema inmunológico a través de varios mecanismos. Esto crea condiciones favorables para el crecimiento de ciertos patobiontes que, en grandes cantidades, alteran el límite de tolerancia del sistema inmunológico del huésped, y crean una cascada de respuesta inflamatoria crónica. Sin embargo, este modelo, a pesar de tener un fundamento sólido, no se puede aplicar a la etiología de la periodontitis en pacientes y localizaciones que no albergan *P. gingivalis*, por lo que requiere más estudios para explicar las circunstancias que permiten que *P. gingivalis* supere el equilibrio de Nash, y pueda catalogarse como el principal causante de la alteración del sistema inmunológico (Bartold y col., 2019; Kumar, 2021).

Disminución de especies beneficiosas.

Es difícil atribuir un papel beneficioso a los microorganismos orales, debido a la escasez de estudios sobre el microbioma oral compatible con la salud. Estudios sobre coagregaciones, asociaciones metabólicas e interacciones antagonistas, han proporcionado evidencia indirecta de que las bacterias bucales podrían contribuir (debido a eventos impredecibles) a la salud bucal, al crear un entorno resistente a la colonización por especies alóctonas (exóticas). Aunque varios estudios sobre el microbioma oral aluden a la "pérdida de la protección de los comensales", en este momento, hay poca evidencia sólida para apoyarlo (Kumar, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

A magnifying glass icon with a dark grey handle and a circular lens. The lens is positioned over the word 'JUSTIFICACIÓN', which is written in a dark blue, serif font. The word 'JUSTIFICACIÓN' is the main focus of the image, with the magnifying glass highlighting it.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial y multidimensional (Caton y col., 2018; Papapanou y col., 2018), muy prevalente en el mundo (Curtis y col., 2020; Abusleme y col., 2021) con una etiología polimicrobiana compleja que puede variar según las características propias de una población (Kassebaum y col., 2014; Carasol y col., 2016). Puede desencadenar importantes consecuencias entre las que están la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, sumado al impacto negativo en la salud general, lo que se traduciría en el comprometimiento de la calidad de vida de quienes las padecen (Kutsal y col., 2021; Fischer y col., 2020), convirtiéndose así en una fuente de desigualdad social al irrumpir en los sistemas de salud de las poblaciones (Holt y col., 2005).

Para unificar y actualizar su diagnóstico clínico, la Academia Americana de Periodoncia y la Federación Europea de Periodoncia se unieron en el World Workshop de 2017 en Chicago, para establecer una Nueva Clasificación de las Condiciones y Enfermedades Periodontales y Periimplantarias (Caton y col., 2018).

Una vez expuestas las conclusiones y resultados, los expertos establecieron, entre otros, los siguientes temas a desarrollar en investigaciones futuras, en beneficio de robustecer la nueva clasificación (Papapanou y col., 2018):

- Validar y perfeccionar continuamente el sistema de clasificación de periodontitis recientemente introducido, mediante la utilización de bases de datos existentes y desarrollar nuevas bases de datos, además de ampliar las bases de datos epidemiológicas existentes para incluir regiones del mundo actualmente subrepresentadas.
- Identificar marcadores microbianos y asociados a la respuesta del huésped que diferencien entre distintos fenotipos de periodontitis, o que permitan determinar su progresión.
- Integrar plataformas de datos multidimensionales (ómicos), para facilitar el estudio de enfermedades y afecciones periodontales.

En adición a lo anterior, aunque a día de hoy se tiene información sobre el papel del microbioma periodontal, gracias a la utilización de tecnologías como la secuenciación

específicamente del gen ARNr 16S (Griffen y col., 2012; Li y col., 2014; Kirst y col., 2015; Wei y col., 2019; Izawa y col., 2021), estos resultados han sido basados en gran medida en el uso exclusivo de este tipo de test de biología molecular descartando en muchos casos al cultivo bacteriano como estándar de referencia (Teles y col., 2013; Montenegro y col., 2020), utilizando sistemas inexactos de agrupación entre secuencias (mayor empleo de OTU que de ASV), pasando por alto la diversidad bacteriana entre poblaciones (Albandar y col., 2005) y empleando clasificaciones periodontales incompletas y desactualizadas (Montenegro y col., 2020).

Por esta razón, y en respuesta a los requerimientos planteadas por el World Workshop de 2017, se hace necesario generar bases de datos actualizadas que expliquen la etiología polimicrobiana de las enfermedades periodontales en las poblaciones, con el objetivo de documentar adecuadamente la nueva clasificación periodontal.

4. ΗΙΠÓΤΕΣΙΣ

A magnifying glass icon with a dark grey handle and a dark blue outline, positioned over the word 'ΣΙΣ' in the title '4. ΗΙΠÓΤΕΣΙΣ'. The magnifying glass is tilted slightly to the right, and its lens is centered over the letters 'ΣΙΣ', making them appear larger and more prominent than the rest of the text.

4.1. HIPÓTESIS GENERAL (H_0):

4.1.1. No existen diferencias estadísticamente significativas al caracterizar y comparar el microbioma subgingival de pacientes de España y Colombia, diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018.

4.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS (H_0):

4.2.1. No existen diferencias estadísticamente significativas al caracterizar y comparar la microbiota subgingival en pacientes, diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018, utilizando cultivo bacteriano **(Estudio #1)**.

4.2.2. No existen diferencias estadísticamente significativas al caracterizar y comparar el microbioma subgingival en pacientes de España y Colombia, diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018, utilizando la técnica de secuenciación de próxima generación del gen ribosómico 16S **(Estudio #2)**.

5. OBJETIVOS



5.1. *Objetivo General.*

Caracterizar y comparar el microbioma subgingival de pacientes de España y Colombia, diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018.

5. 2. *Objetivos Específicos.*

5.2.1. Caracterizar y comparar la microbiota subgingival en pacientes diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018, utilizando cultivo bacteriano (**Estudio #1**).

5.2.2. Caracterizar y comparar el microbioma subgingival en pacientes de España y Colombia, diagnosticados según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018, utilizando la técnica de secuenciación de próxima generación del gen ribosómico 16S (**Estudio #2**).

6. METODOLOGÍA

A magnifying glass icon with a dark grey handle and a circular lens. The lens is positioned over the word 'GÍA' in the title '6. METODOLOGÍA', which is written in a dark blue, serif font. The magnifying glass is tilted slightly to the right.

Estudios #1 y #2:

MÉTODOS COMUNES PARA AMBOS ESTUDIOS.

Para resolver el problema de investigación de la presente tesis doctoral, se llevó a cabo un estudio de corte transversal, con dos análisis diferentes (Estudio #1 y Estudio #2), los cuales, junto con los consentimientos informados que debieron firmar los pacientes reclutados, fueron aprobados por los comités éticos de las instituciones involucradas (referencias 18/127-E en España y 012-2018 en Colombia) teniendo en cuenta los lineamientos éticos internacionales de la Declaración de Helsinki relacionados con la experimentación en humanos. Además ambos manuscritos siguieron las directrices para la Guía *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) para la presentación de informes de estudios transversales (von Elm y col., 2014).

Sujetos.

Ambos estudios se realizaron en sujetos de las clínicas de las Facultades de Odontología de la Universidad El Bosque (UIBO) de Bogotá, Colombia, y de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), España. Los pacientes fueron seleccionados desde abril de 2018 hasta marzo de 2020, de acuerdo con los siguientes criterios (Lafaurie y col., 2007; Botero y col., 2007; Mayorga Fayad y col., 2007; Herrera y col., 2008; Montero y col., 2017):

Criterios de inclusión.

Se incluyeron en el estudio adultos de 30 a 65 años, categorizados por sus condiciones periodontales, de acuerdo con los siguientes criterios:

- Sujetos con salud y gingivitis, como controles. Sin pérdida de inserción clínica (CAL, por las siglas del inglés de *clinical attachment level*) ni pérdida ósea radiográfica (RBL, por las siglas del inglés de *radiographic bone level*) y profundidades de sondaje (PD, por las siglas del inglés de *pocket depth*) de ≤ 3 mm, asumiendo que no hay pseudobolsas (Chapple y col., 2018).

- Periodontitis en estadios I o II. Siguiendo los criterios de gravedad, CAL interdental de 1-2 mm (estadio I) o 3-4 mm (estadio II) y RBL que afecta solo al tercio coronal de la raíz (<15% para estadio I y 15-33% para estadio II) (Papapanou y col., 2018).
- Periodontitis en estadios III o IV. Siguiendo los criterios de gravedad, CAL interdental ≥ 5 mm y RBL que se extiende hasta el tercio medio o apical de la raíz. Debe haber evidencia de pérdida de ≤ 4 dientes debido a razones periodontales en el estadio III y de ≥ 5 dientes en el estadio IV (Papapanou y col., 2018). Si es necesario, y utilizando los criterios de complejidad, afectación de furca de clase II o III.
- Periodontitis en grado A. Porcentaje de RBL/edad $< 0,25$, grandes depósitos de biopelícula con bajos niveles de destrucción, no fumador.
- Periodontitis en grado B. Porcentaje de RBL/edad 0,25 a 1,0, destrucción proporcional a los depósitos de biopelícula, fumador < 10 cigarrillos / día.
- Periodontitis en grado C. Porcentaje de RBL/edad $> 1,0$, la destrucción excede la expectativa dados los depósitos de biopelícula, fumador ≥ 10 cigarrillos / día.

Criterios de exclusión.

- Tratamiento periodontal no quirúrgico y quirúrgico (receptivo y regenerativo) el año previo a la toma de la muestra.
- Afecciones periodontales agudas (abscesos periodontales o enfermedades periodontales necrotizantes) en el momento de la toma de la muestra.
- Ingesta de antibióticos en los últimos tres meses.
- Enfermedades sistémicas (diabetes, trastornos del sistema inmunológico, etc.).
- Embarazo.
- Uso prolongado de medicamentos antiinflamatorios, anticonvulsivantes (fenitoína, ácido valproico, carbamazepina, fenobarbital, vigabatrina), inmunosupresores (ciclosporina A), bloqueadores de los canales de calcio (nifedipina, diltiazem, verapamilo, amlodipino y felodipino), seis meses antes o al momento de la recolección de la muestra.

Visita de Estudio y Examen Clínico (Figura 4).

En caso de ser seleccionados, a los pacientes se les registraron los datos sociodemográficos (edad, género y país) y junto con el cuestionario médico, se les solicitó firmar el consentimiento informado. Posteriormente se procedió al examen periodontal completo con el uso complementario de radiografías. Por último se tomaron muestras subgingivales. Los parámetros clínicos fueron evaluados por dos examinadores calibrados (uno de cada país). Se realizó una calibración intra-examinador donde se registraron mediciones duplicadas de PD y CAL en tres pacientes, dos veces durante la misma visita, con intervalos de 30 minutos y se calculó la reproducibilidad intraclase.

El coeficiente de correlación interclase (CCI) mostró un 90,2% de concordancia para PD y 89% para CAL en Colombia, y de 86,3% y 84,7%, respectivamente, en España.

Se midieron seis localizaciones por diente en todos los dientes, excepto los terceros molares y los implantes (si estuviesen presentes en boca), con una sonda periodontal UNC-15 (HuFriedy, Leinmen, Alemania) teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Recesión gingival (REC, por las siglas del inglés de *gingival recession*), medida como la distancia desde la unión amelo-cementaria (CEJ, por las siglas del inglés de *cemento-enamel junction*) al margen gingival y registrada al milímetro más cercano.
- PD, medido desde el margen gingival hasta la parte inferior del surco/bolsa y registrado al milímetro más cercano.
- CAL, medida como la distancia desde el fondo de la bolsa al CEJ.
- Sangrado al sondaje (BoP, por las siglas del inglés de *bleeding on probing*), medido después del sondaje hasta la base de la bolsa y expresado como porcentaje (Badersten y col., 1985).
- Índice de placa (PII, por las siglas del inglés de *plaque index*), evaluadas por la presencia de placa dental visible, dado a conocer por la tinción de eritrosina (Plac-Control®, Dentaïd, Barcelona, España) y se expresó en porcentaje (O'Leary y col., 1972).

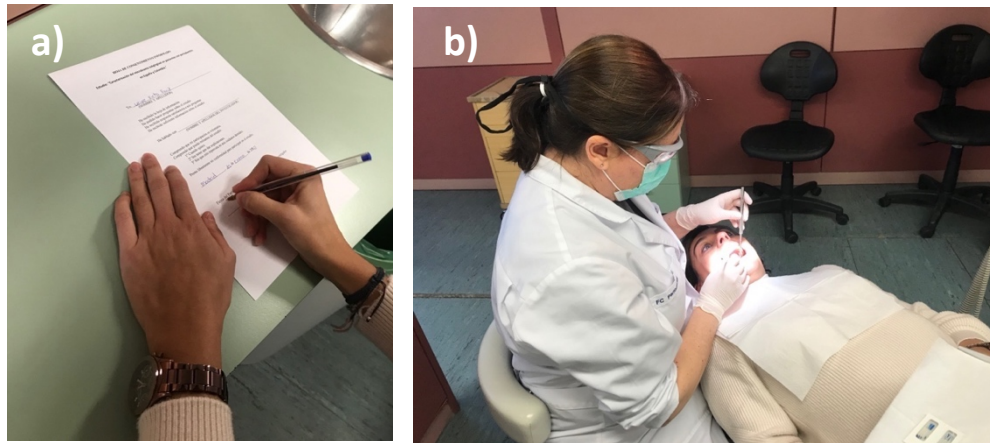


Figura 4. a) Firma del consentimiento informado por parte del paciente.

b) Examen clínico mediante el cual se estableció el diagnóstico (abril de 2018 a marzo de 2020).

En la foto: Dra. Margarita Iniesta Albentosa realizando el examen clínico.

Toma de Muestras Microbiológicas (Figura 5).

Se tomaron muestras de cuatro localizaciones seleccionadas, por medio de dos puntas de papel estériles #30 estandarizadas (Maillefer, Ballaigues, Suiza) consecutivas por localización. Las puntas de papel se insertaron en el surco o bolsa y se dejaron en su lugar durante 10 segundos. Antes de la toma, se eliminó la placa supragingival de la localización elegida, seguido de aislamiento de la saliva con el uso de rollos de algodón y aire comprimido. Las localizaciones para la toma de las muestras se seleccionaron de la siguiente manera:

- En sujetos sanos/gingivitis, se tomaron muestras subgingivales de las localizaciones mesiobucales de los primeros molares y en su ausencia, de los segundos molares adyacentes (la siguiente alternativa fueron los segundos premolares y desde allí, los dientes presentes mesialmente).
- En sujetos con periodontitis, se tomaron muestras subgingivales de la localización más accesible con la PD y la BoP más profundas, por cuadrante.

Todas las puntas de papel se transfirieron a un vial con tapón de rosca que contenía 1,5 ml de líquido de transporte reducido (RTF) (Syed y col., 1972), el cual fue utilizado tanto en el cultivo bacteriano, como en la extracción del ADN para la secuenciación del gen ARNr 16S.

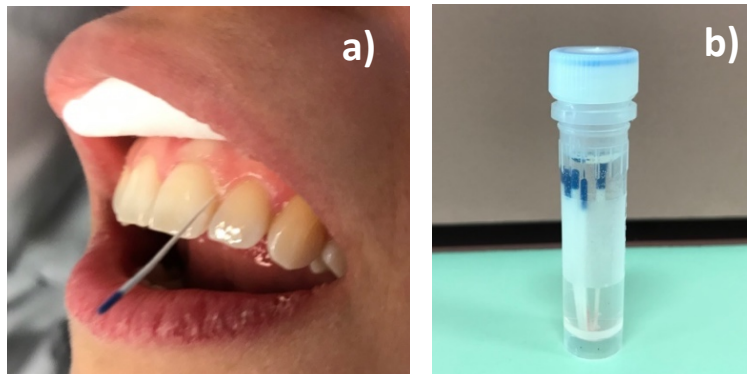


Figura 5. a) Toma de muestra subgingival; b) Puntas de papel en medio de transporte (RTF).

A continuación se describe la metodología específica para cada uno de los estudios realizados.

Estudio #1:

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE SUBGINGIVAL EN PACIENTES CON DIFERENTES ESTADIOS DE PERIODONTITIS EN ESPAÑA Y COLOMBIA. UN ESTUDIO TRANSVERSAL

Cultivo Bacteriano.

Las muestras subgingivales se enviaron a los laboratorios microbiológicos de cada centro en un plazo máximo de 24 horas. En los laboratorios (UCM, UIBO), las muestras se homogeneizaron mediante agitación en vórtex durante 30 segundos, se realizaron cuatro diluciones seriadas en solución salina tampón fosfato (PBS) y se colocaron 100 μ L en: (i) medio agar sangre no selectivo (Blood Agar Base II, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado con hemina (5 mg/L), menadiona (1 mg/L) y sangre de caballo estéril al 5% para la determinación de los recuentos anaerobios totales y para la identificación de la mayoría de los patógenos diana; y (ii) en el medio selectivo Dentaïd-1 (Alsina y col., 2001) para el aislamiento y cuantificación de *A. actinomycetemcomitans*. Las placas de agar sangre se incubaron durante 14 días en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂) a 37 ° C, y las placas de agar selectivo se incubaron durante 3 días al aire con 5% de CO₂ a 37 ° C. Después de la incubación, se realizó la identificación inicial de las especies objetivo utilizando la morfología de la colonia, y las colonias sospechosas se identificaron adicionalmente mediante microscopio, tinción de Gram y actividad enzimática. Se llevaron a cabo recuentos de colonias representativas (aquellas con morfologías de colonia compatibles con la morfología del patógeno diana). El recuento se realizó en placas con 30 a 300 colonias.

Análisis de los datos.

Cálculo del tamaño de la muestra.

La variable de resultado seleccionada para calcular el tamaño de la muestra fue el recuento de *P. gingivalis*. Fueron necesarios 30 pacientes por grupo basado en una diferencia esperada entre los grupos sanos/gingivitis y periodontitis en la media de recuentos (expresados como unidades formadoras de colonias, UFC, 2900), con una desviación estándar (DE) de 3008,75 (van Winkelhoff y col., 2002 b), un error alfa de 0,05 y una potencia del 90%. Además, y con el fin de estrechar las diferencias entre distintos grupos de edad en diferentes condiciones, la muestra general siguió un muestreo estratificado uniforme, en el que se asignó el mismo tamaño para todos los estratos definidos. La distribución de la muestra deseada fue de 30 pacientes para cada grupo de estado periodontal (sanos y gingivitis, periodontitis en estadios I o II, periodontitis en estadios III o IV) y 10 pacientes para cada cohorte de edad (30-40 años, 41-50 años, 51 a 60 años, dentro de cada categoría de estado periodontal).

Análisis estadístico.

Para los datos continuos y la distribución de datos para evaluar la normalidad, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos clínicos y microbiológicos se calcularon por paciente y luego por grupo de estado periodontal y país. La transformación logarítmica de CFU de recuentos bacterianos se diseñó para normalizar la distribución de datos. Los datos se expresaron como medias y DE, y como mediana y rangos intercuartílicos (RI) para los datos no paramétricos. Los datos categóricos se expresaron como porcentajes.

Se realizaron análisis del estado periodontal y a nivel de país. Para el análisis de nivel de estado periodontal, los datos demográficos se analizaron mediante la prueba ANOVA para variables continuas y la prueba de chi-cuadrado para datos categóricos, con valores de probabilidad ajustados con la corrección de Bonferroni. Los *p*-valores se multiplicaron por

el número de comparaciones (tres para el estado periodontal y quince para el estado periodontal por país). Las variables clínicas y microbiológicas se compararon mediante la prueba ANOVA, para datos paramétricos, o la prueba de Kruskal-Wallis con pruebas post hoc de Dunn-Bonferroni, para datos no paramétricos. Para los datos categóricos se utilizó la prueba de chi-cuadrado, con corrección de Bonferroni para multiplicidad cuando fue necesario. Para el análisis a nivel de país, las variables demográficas continuas se compararon con la prueba t para datos paramétricos, o la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos, además de pruebas de chi-cuadrado para variables categóricas.

Se realizó una regresión logística progresiva paso a paso para explorar la relación entre la frecuencia de detección de bacterias (sí/no) y las covariables de país, tabaquismo, estado periodontal y edad. Los estados periodontales (salud periodontal/gingivitis, periodontitis estadios I-II, periodontitis estadios III-IV) se introdujeron como variables ficticias. Se realizó una segunda comparación con una estratificación por rango de edad con país, tabaquismo y estado periodontal como covariables. Se calcularon los *odds ratios* (OR) junto con los intervalos de confianza (IC) del 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de programa SPSS 20 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.) Y el nivel de significación se estableció en 0,05.

Estudio #2

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL EN PACIENTES CON DIFERENTES ESTADIOS DE PERIODONTITIS EN ESPAÑA Y COLOMBIA.

Amplificación del gen ARNr 16S, secuenciación y procesamiento.

Después de la realización del cultivo bacteriano en el Estudio #1, se eliminaron las puntas de papel y se preparó el líquido restante del vial para la extracción de ADN. Las muestras españolas fueron enviadas a Colombia para su almacenamiento junto con las muestras colombianas, en la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) y en la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA), de la Universidad El Bosque de Bogotá, Colombia, para su posterior análisis. En el instituto UGRA de la Universidad El Bosque de Bogotá, Colombia, todas las muestras se sometieron a caracterización de diversidad bacteriana mediante secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S utilizando la plataforma Illumina MiSeq. Los cebadores 515-F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') y 806-R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3') se utilizaron para amplificar la región hipervariable V4, la cual se considera es la región más informativa para describir las comunidades bacterianas (Caporaso y col., 2011). Para todas las muestras, el ADN se obtuvo utilizando el mini kit de extracción QIAamp (Quiagen, Alemania), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Una vez obtenido el ADN, se realizó la verificación de la calidad del ADN determinando los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 para verificación de pureza en un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). Para los geles de electroforesis para verificación de integridad y cuantificación específica de ADN de doble hebra por fluorimetría, se utilizó el fluorómetro Qubit 3.0 (Life Technologies-Invitrogen). Una vez que se confirmaron la pureza y la cantidad superior a 1,0 µg / ml, se realizó la amplificación.

La preparación de la biblioteca de amplicones se realizó en un procedimiento de PCR de dos pasos. Brevemente, la primera PCR (incluida una región enlazadora en el extremo 5' del cebador (Pacheco-Montealegre y col., 2020), se realizó por triplicado, y la segunda PCR agregó códigos de barras a los amplicones de rRNA 16S, así como a las regiones adaptadoras Illumina i5 e i7 (Caro-Quintero y col., 2015). Los productos de PCR de ambas amplificaciones se analizaron en geles de agarosa (1,5%) y las concentraciones de ADN se cuantificaron en un kit de ensayo Qubit™ dsDNA HS y BR (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se combinaron en concentraciones equimolares y se secuenciaron en pares (lecturas de 250 nt) en Illumina MiSeq. Se detectaron lecturas de secuenciación y Variantes de Secuencia de Amplicones (ASV) utilizando el complemento DADA2 en QIIME2 versión 2020.11 (Callahan y col., 2016; Bolyen y col., 2019). El proceso incluyó el recorte de calidad de las lecturas, la eliminación de réplicas y el filtrado de quimeras. La tabla de características resultante se filtró aún más, descartando los ASVs con menos de 10 secuencias. Los ASVs se asignaron a categorías taxonómicas utilizando NCBI BLASTn v 2.2.23 (Johnson y col., 2008) frente a la base de datos ampliada del microbioma oral humano (eHOMD) (Escapa y col., 2018), utilizando un umbral de identidad de $\geq 97\%$ para asignar un ASV a una categoría taxonómica. Se descartaron los taxones raros (< 100 recuentos en todas las muestras).

Métricas de diversidad alfa.

La riqueza (taxones observados), el índice de Shannon y el índice de Simpson, se calcularon utilizando PAST v4.07b (Hammer y col., 2001).

Análisis de los datos.

Cálculo del Tamaño Muestral.

El número de pacientes se ha determinado, mediante la muestra aproximada utilizada en estudios similares que utilizaron la misma técnica de secuenciación (Griffen y col., 2012;

Zhuang y col., 2014; Jorth y col., 2014; Szafranski y col., 2015; Kirst y col., 2015; Dabdoub y col., 2016; Chen y col., 2018). El muestreo de pacientes corresponde entonces a una muestra no probabilística, y específicamente a una muestra de criterio o medio especial (muestreo por conveniencia).

Análisis Estadístico.

Las variables clínicas se compararon mediante la prueba ANOVA, para datos paramétricos, o la prueba de Kruskal-Wallis con pruebas post hoc de Dunn-Bonferroni, para datos no paramétricos.

La comparación estadística de los estimadores de diversidad entre los grupos de muestra analizados (salud periodontal/gingivitis, estadios I-II y estadios III-IV) se realizó mediante la prueba estadísticas no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para identificar posibles diferencias en taxones específicos entre grupos y diferencias entre grupos y países (Colombia y España), se realizó la prueba t de Welch utilizando el software STAMP v 2.1.3 (Parks y col., 2014). Las diferencias significativas se visualizaron mediante un diagrama de barras de error extendido. El nivel de significancia se estableció en 0,05.

7. RESULTADOS



Estudio #1:

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE SUBGINGIVAL EN PACIENTES CON DIFERENTES ESTADIOS DE PERIODONTITIS EN ESPAÑA Y COLOMBIA. UN ESTUDIO TRANSVERSAL

Población de estudio.

Inicialmente se reclutaron un total de 199 pacientes, pero se excluyeron cuatro pacientes en España y 25 en Colombia. Los motivos de exclusión en España fueron la edad o problemas técnicos, y en Colombia, presentar enfermedades sistémicas, la edad y haber tomado antibióticos en los últimos tres meses. La muestra final estuvo formada por 167 pacientes (España n= 90 y Colombia n= 77): 30 y 18, respectivamente, con salud periodontal y gingivitis; 30 y 23, respectivamente, con periodontitis en estadios I-II; y 30 y 36, respectivamente, con periodontitis en estadios III-IV. En cada grupo se consideraron tres rangos de edad: 30-40, 41-50 y 51-60 años (Tabla 4).

El estatus socioeconómico no se evaluó específicamente. Solo se seleccionaron pacientes de origen español (de etnia española-caucásica) y solo pacientes de origen colombiano (de etnia mestiza de Colombia). Solo dos pacientes (en España) habían recibido tratamiento periodontal en el pasado (instrumentación subgingival), sin cuidados periodontales de mantenimiento durante al menos 3 años.

Tabla 4. Sujetos seleccionados (*n*, número de pacientes) según país, grupo de estado periodontal y edad.

	Estado Periodontal	Edad	España (n)	Colombia (n)
Sujetos seleccionados por país			90	77
Sujetos seleccionados por grupo de estado periodontal y país	Salud y Gingivitis		30	18
	Periodontitis I-II		30	23
	Periodontitis III-IV		30	36
Sujetos seleccionados por grupo de estado periodontal, edad y país		30-40	10	7
	Salud y Gingivitis	41-50	10	5
		51-60	10	6
		30-40	10	11
	Periodontitis I-II	41-50	10	6
		51-60	10	6
		30-40	10	11
	Periodontitis III-IV	41-50	10	16
		51-60	10	9

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en edad ($p=0,170$), género ($p=0,409$) y hábito tabáquico ($p=0,064$), entre los grupos según su estado periodontal (Tabla 5). Al comparar sujetos de los distintos países, no se detectaron diferencias significativas en la edad ($p=0,242$), ni en el género ($p=0,972$), pero sí se evidenció un porcentaje significativamente menor de fumadores en los pacientes colombianos (9,1%), en comparación con los pacientes españoles (26,7 %) ($p=0,004$). Al comparar el impacto tanto del estado periodontal como del país, no se observaron diferencias significativas para la edad y el género, mientras que un porcentaje más alto estadísticamente significativo de fumadores, en sujetos españoles versus colombianos, se observó en periodontitis en estadios I-II (30,0% versus 4,3% , respectivamente) ($p=0,031$) y en periodontitis en estadios III-IV (40,0% versus 11,1%, respectivamente) ($p=0,006$), en comparación con pacientes colombianos para los mismos grupos de estado periodontal.

Tabla 5. Descripción de las características de la población de la muestra (variables demográficas y tabaquismo) y comparaciones según estado periodontal y país.

Comparación	Primera comparación	Segunda comparación	Edad ^a			Género ^b			Hábito de fumar ^b			P valor			
			n	Media (DE)	P valor	Femenino n %	Masculino n %	P valor	No fumadores n %	Fumadores n %					
Grupo de estado periodontal	Salud y Gingivitis		48	45,13 (9,71)	26	54,2	22	45,8	43	89,6	5	10,4	0,064		
	Periodontitis I-II		53	43,72 (8,77)	0,170	30	56,6	23	43,4	0,409	43	81,1		10	18,9
	Periodontitis III-IV		66	45,32 (8,00)		31	47,0	35	53,0		50	75,8		16	24,2
Estado periodontal por país	Salud y Gingivitis	España	30	44,97 (8,28)	16	53,3	14	46,7	27	90,0	3	10,0	0,045, Periodontitis I-II (Colombia) versus Periodontitis III-IV (España)		
		Colombia	18	45,39 (11,99)	10	55,6	8	44,4	16	88,9	2	11,1			
	Periodontitis I-II	España	30	45,17 (8,04)	0,588	16	53,3	14	46,7	1,000	21	70,0		9	30,0
		Colombia	23	41,83 (9,49)		14	60,9	9	39,1		22	95,7		1	4,3
	Periodontitis III-IV	España	30	46,33 (8,25)		15	50,0	15	50,0		18	60,0		12	40,0
		Colombia	36	44,47 (7,81)		16	44,4	20	55,6		32	88,9		4	11,1

DE, desviación estándar; n, número de pacientes. ^a, test de ANOVA de una sola vía. ^b, test de Chi cuadrado test con corrección de Bonferroni.

Variables de resultado clínico.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estado periodontal, tanto para la media de CAL, BoP y PD, como para la proporción de bolsas en las categorías 1-3mm y 4-5mm ($p < 0,001$). Para la proporción de bolsas profundas (≥ 6 mm), solo se detectaron diferencias significativas al comparar salud-gingivitis con periodontitis I-II ($p < 0,001$) y periodontitis I-II con periodontitis III-IV ($p < 0,001$). PII solo presentó diferencias estadísticamente significativas al comparar salud-gingivitis con periodontitis I-II y con periodontitis III-IV ($p < 0,001$) (Tabla 6). La distribución de grados de periodontitis no mostró ninguna diferencia entre grados o entre países (Tabla S1).

Tabla 6. Comparación de parámetros clínicos entre países (primera comparación) y entre grupos de estado periodontal (segunda comparación).

	Primera comparación	Salud y Gingivitis ^a			Periodontitis I-II ^a			Periodontitis III-IV ^a			Segunda Comparación (entre Estados periodontales ^a)	
		n	Media (DE)	P valor	n	Media (DE)	P valor	n	Media (DE)	P valor	P valor	
PD (mm)	España	30	2,26 (0,31)	0,359	30	2,90 (0,39)	0,037	30	4,04 (0,76)	0,069	<0,001	
	Colombia	18	2,17 (0,27)		23	3,19 (0,57)		36	3,72 (0,65)			
PD 1-3 mm (%)	España	30	98,37 (3,14)	0,148	30	77,38 (14,17)	0,073	30	43,08 (21,77)	0,083	<0,001	
	Colombia	18	94,83 (12,62)		23	68,42 (21,38)		36	50,19 (9,73)			
PD 4-5 mm (%)	España	30	1,60 (3,12)	0,145	30	20,78 (12,71)	0,110	30	38,04 (14,06)	0,170	<0,001	
	Colombia	18	5,16 (12,62)		23	24,07 (17,07)		36	33,41 (13,00)			
PD ≥ 6 mm (%)	España	30	0,01 (0,10)	0,445	30	1,82 (2,06)	0,174	30	18,86 (14,52)	0,424	<0,001, Salud y Gingivitis versus Periodontitis III-IV	
	Colombia	18	0		23	3,19 (4,91)		36	16,36 (10,66)		<0,001, Periodontitis I-II versus Periodontitis III-IV	
CAL (mm)	España	30	0,33 (0,24)	0,521	30	3,07 (0,39)	0,660	30	4,78 (0,85)	0,237	<0,001	
	Colombia	18	0,28 (0,26)		23	3,16 (0,96)		36	4,52 (0,93)			
BoP (%)	España	30	15,53 (15,01)	0,251	30	32,71 (17,01)	<0,001	30	63,87 (26,33)	0,024	<0,001	
	Colombia	18	10,94 (9,45)		23	68,82 (38,93)		36	79,69 (28,65)			
PII (%)	España	30	50,97 (25,07)	<0,001	30	62,69 (25,59)	0,736	30	76,00 (24,20)	0,465	<0,001, Salud y Gingivitis versus Periodontitis I-II	
	Colombia	18	22,77 (13,78)		23	65,86 (38,77)		36	70,27 (36,49)		<0,001, Salud y Gingivitis versus Periodontitis III-IV	

Profundidad de bolsa (PD); nivel de inserción clínica (CAL); sangrado al sondaje (BoP); índice de placa (PII). DE, desviación estándar; n, número de pacientes.

Tabla S1. Distribución de grados de periodontitis por país.

	Primera comparación	España		Colombia		Segunda comparación (entre países ^a)	
		n	%	n	%	P valor	P valor
Grado	A	8	13,3	7	11,9	1,000	1,000
	B	24	40,0	26	44,1		
	C	28	46,7	26	44,1		

n, número de pacientes; %, porcentaje. ^a, test de Chi-cuadrado con corrección de Bonferroni.

Grados de periodontitis:

La estimación indirecta se realizó utilizando la pérdida ósea en función de la edad en el diente o la presentación del caso más afectado (pérdida ósea radiográfica (RBL) expresada como porcentaje de la longitud de la raíz dividida por la edad del sujeto, RBL / edad):

- Periodontitis en grado A. Porcentaje de RBL/edad <0,25, grandes depósitos de biopelícula con bajos niveles de destrucción, no fumador.
- Periodontitis en grado B. Porcentaje de RBL/edad 0,25 a 1,0, destrucción proporcional a los depósitos de biopelícula, fumador <10 cigarrillos / día.
- Periodontitis en grado C. Porcentaje de RBL/edad >1,0, la destrucción excede la expectativa dados los depósitos de biopelícula, fumador ≥10 cigarrillos / día.

Al evaluar el estado periodontal y el país, se observaron medias mayores estadísticamente significativas en PD ($p=0,037$) y BoP ($p<0,001$), en sujetos colombianos en el grupo de periodontitis en estadios I-II, y también se observaron valores mayores de BoP estadísticamente significativos de periodontitis en estadios III-IV ($p=0,024$). Por el contrario, en España se observó un mayor PII ($p<0,001$) en el grupo de salud/gingivitis (Tabla 6). Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estado periodontal, tanto para la media de CAL, BoP y PD, como para la proporción de bolsas en las categorías 1-3 mm y 4-5 mm ($p<0,001$). Para la proporción de bolsas profundas (≥ 6 mm) solo se detectaron diferencias significativas al comparar salud/gingivitis con periodontitis I-II ($p<0,001$), y periodontitis I-II con periodontitis III-IV ($p<0,001$). PII solo presentó diferencias estadísticamente significativas al comparar salud/gingivitis con periodontitis I-II y con periodontitis III-IV ($p<0,001$) (Tabla 6).

Las características clínicas de las localizaciones muestreadas fueron similares para todos los estados periodontales y para ambos países, excepto PII, que mostró niveles significativamente más altos en el grupo salud/gingivitis en España que en Colombia ($p<0,001$) (Tabla S2).

Tabla S2. Características clínicas de las localizaciones seleccionadas para toma de muestras subgingival.

		Salud y Gingivitis			Periodontitis I-II			Periodontitis III-IV		
		n	Media (DE)	<i>p</i> valor*	n	Media (DE)	<i>p</i> valor*	n	Media (DE)	<i>p</i> valor*
PD (mm)	España	30	2,79 (0,39)	0,271	30	4,43 (0,69)	0,203	30	6,10 (1,29)	0,280
	Colombia	18	2,66 (0,33)		23	4,71 (0,91)		36	5,79 (1,01)	
CAL (mm)	España	30	0	1,000	30	4,09 (0,31)	0,411	30	6,47 (1,31)	0,824
	Colombia	18	0		23	3,92 (1,05)		36	6,39 (1,52)	
BoP (%)	España	30	36,66 (40,86)	0,060	30	87,50 (21,52)	0,111	30	95,00 (13,77)	0,158
	Colombia	18	15,27 (29,87)		23	95,65 (12,27)		36	98,61 (5,80)	
PII (%)	España	30	55,00 (32,43)	<0,001	30	80,00 (28,16)	0,126	30	93,33 (15,99)	0,070
	Colombia	18	9,72 (22,91)		23	91,30 (23,36)		36	98,61 (5,80)	

Profundidad de bolsa (PD); nivel de inserción clínica (CAL); sangrado al sondaje (BoP); índice de placa (PII). DE, desviación estándar; n, número de pacientes. *, test de t de Student.

Microbiota cultivable subgingival-recuentos anaeróbicos totales.

Se observaron recuentos anaeróbicos totales más bajos estadísticamente significativos para el grupo de salud/gingivitis, en comparación con el grupo de periodontitis en estadios I-II ($p=0,029$) y de la periodontitis en estadios III-IV ($p=0,010$). En general, se observaron recuentos significativamente más altos en los pacientes colombianos ($p=0,036$), junto con un rango de variabilidad más bajo. Al comparar el impacto tanto del estado periodontal como del país, se observaron recuentos más altos estadísticamente significativos en Colombia para el grupo de salud/gingivitis ($p=0,001$), en comparación con España (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de recuentos anaeróbicos totales (transformada logarítmica) entre grupos de estado periodontal (primera comparación) y entre países (segunda comparación).

	Primera comparación	Salud y Gingivitis ^a			Periodontitis I-II ^b			Periodontitis III-IV ^c			Segunda Comparación (entre Estados periodontales ^b)	
		n	Media (DE)	P valor	n	Media (DE)	P valor	n	Media (DE)	P valor	P valor	
PD (mm)	España	30	2,26 (0,31)	0,359	30	2,90 (0,39)	0,037	30	4,04 (0,76)	0,069	<0,001	
	Colombia	18	2,17 (0,27)		23	3,19 (0,57)		36	3,72 (0,65)			
PD 1-3 mm (%)	España	30	98,37 (3,14)	0,148	30	77,38 (14,17)	0,073	30	43,08 (21,77)	0,083	<0,001	
	Colombia	18	94,83 (12,62)		23	68,42 (21,38)		36	50,19 (9,73)			
PD 4-5 mm (%)	España	30	1,60 (3,12)	0,145	30	20,78 (12,71)	0,110	30	38,04 (14,06)	0,170	<0,001	
	Colombia	18	5,16 (12,62)		23	24,07 (17,07)		36	33,41 (13,00)			
PD ≥ 6 mm (%)	España	30	0,01 (0,10)	0,445	30	1,82 (2,06)	0,174	30	18,86 (14,52)	0,424	<0,001, Salud y Gingivitis versus Periodontitis III-IV	
	Colombia	18	0		23	3,19 (4,91)		36	16,36 (10,66)		<0,001, Periodontitis I-II versus Periodontitis III-IV	
CAL (mm)	España	30	0,33 (0,24)	0,521	30	3,07 (0,39)	0,660	30	4,78 (0,85)	0,237	<0,001	
	Colombia	18	0,28 (0,26)		23	3,16 (0,96)		36	4,52 (0,93)			
BoP (%)	España	30	15,53 (15,01)	0,251	30	32,71 (17,01)	<0,001	30	63,87 (26,33)	0,024	<0,001	
	Colombia	18	10,94 (9,45)		23	68,82 (38,93)		36	79,69 (28,65)			
PLI (%)	España	30	50,97 (25,07)	<0,001	30	62,69 (25,59)	0,736	30	76,00 (24,20)	0,465	<0,001, Salud y Gingivitis versus Periodontitis I-II	
	Colombia	18	22,77 (13,78)		23	65,86 (38,77)		36	70,27 (36,49)		<0,001, Salud y Gingivitis versus Periodontitis III-IV	

DE, desviación estándar; n, número de pacientes; IC, intervalo de confianza * , grupo de salud y gingivitis versus grupo de periodontitis I-II. †, grupo de periodontitis I-II versus grupo de periodontitis III-IV. ‡, grupo de salud y gingivitis versus grupo de periodontitis III-IV. §, España versus Colombia. ^a, test de ANOVA de una sola vía.

Patógenos de la microbiota-periodontal cultivables subgingivales.

En general, las especies bacterianas detectadas con mayor frecuencia fueron *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Capnocytophaga* spp. y *Actinomyces odontolyticus*.

Estas especies patógenas, junto con *Fusobacterium nucleatum*, también estuvieron presentes en recuentos y proporciones relativamente altas. No se detectó *A. actinomycetemcomitans* en ninguna de las muestras estudiadas.

Se observaron recuentos, proporciones y frecuencia de detección estadísticamente significativos más altos de *P. gingivalis* para periodontitis en estadios I-II en comparación con salud/gingivitis ($p \leq 0,05$). Lo contrario sucedió para *Eikenella corrodens*, con valores y frecuencia de detección más bajos en periodontitis estadios III-IV, cuando se comparó con salud/gingivitis ($p \leq 0,05$). Además, *P. micra* mostró recuentos ($p=0,006$), proporciones ($p=0,009$) y frecuencia de detección ($p=0,009$) estadísticamente significativos más bajos, en periodontitis estadios III-IV, en comparación con salud/gingivitis (Tabla 8).

Al comparar países, se observaron recuentos, proporciones y frecuencia de detección más altos estadísticamente significativos de *P. gingivalis* y *Campylobacter rectus* en España ($p < 0,001$). Por el contrario, las muestras de pacientes colombianos mostraron recuentos, proporciones y frecuencia de detección significativamente más altos de *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp. y *A. odontolyticus* ($p < 0,001$), y recuentos y proporciones significativamente más altos de *Prevotella intermedia* y *F. nucleatum* ($p \leq 0,05$) (Tabla 8). Al evaluar el impacto tanto del estado periodontal como del país, para la periodontitis en estadios I-II (Tabla S3), los recuentos y proporciones de *F. nucleatum*, y las proporciones y frecuencia de detección de *P. micra*, *Capnocytophaga* spp. y *A. odontolyticus* fueron significativamente mayores en los pacientes colombianos, en comparación con los pacientes españoles, quienes mostraron una mayor frecuencia de detección de *P. gingivalis* ($p < 0,001$) y *P. intermedia* ($p=0,014$), y mayores recuentos, proporciones y detección frecuencias de *E. corrodens* ($p \leq 0,05$). Para periodontitis en estadios III-IV (Tabla S4), los recuentos, proporciones y frecuencia de detección de *Capnocytophaga* spp. y *A. odontolyticus* fueron mayores en Colombia, en contraste con una mayor frecuencia de detección de *P. gingivalis* ($p \leq 0,05$) en España. En el grupo de salud/gingivitis (Tabla S5), se observaron recuentos, proporciones y frecuencia de detección significativamente más altos en Colombia de *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp. y de *A. odontolyticus*, además de recuentos más altos de *F. nucleatum* ($p \leq 0,05$).

Tabla 8. Media y desviación estándar (DE) y mediana y rango intercuartílico (RI) de recuentos (logarítmico transformado), proporciones y frecuencias de detección de especies bacterianas diana según estado periodontal y país.

Los recuentos y proporciones se calcularon considerando todas las muestras.

	Estado periodontal (grupo)	País	Conteos ^a			Proporciones ^a			Frecuencia ^b			
			n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n (%)	P valor
<i>P. gingivalis</i>	Salud y Gingivitis		48	2,34 (2,66)	0,00 (5,48)	0,014*	48	5,88 (12,22)	0,00 (6,75)	0,007*	22 (45,8)	0,006*
	Periodontitis I-II		53	4,15 (2,51)	5,00 (3,77)	1,000†	53	14,57 (20,67)	3,72 (18,50)	0,512‡	40 (75,5)	0,123‡
	Periodontitis III-IV		66	3,38 (2,97)	5,00 (6,07)	0,062‡	66	10,28 (15,08)	3,27 (17,29)	0,195‡	38 (57,6)	0,645‡
		España	90	4,34 (2,33)	5,12 (1,95)	<0,001§	90	13,28 (17,52)	5,83 (18,16)	<0,001§	72 (80,0)	<0,001§
	Colombia	77	2,14 (2,88)	0,00 (5,60)	77		6,99 (14,93)	0,00 (5,06)	28 (36,4)			
<i>P. intermedia</i>	Salud y Gingivitis		48	3,55 (2,48)	4,15 (5,78)		48	5,59 (8,59)	0,92 (5,22)		35 (72,9)	0,978*
	Periodontitis I-II		53	3,95 (2,11)	4,69 (2,24)	0,294	53	4,97 (8,48)	0,90 (5,66)	0,497	43 (81,1)	1,000†
	Periodontitis III-IV		66	4,17 (2,30)	5,00 (1,95)		66	7,15 (10,24)	2,33 (12,11)		52 (78,8)	1,000‡
		España	90	3,56 (2,14)	4,00 (2,77)	<0,001§	90	3,16 (6,39)	0,66 (3,33)	<0,001§	70 (77,8)	0,982§
	Colombia	77	4,35 (2,41)	5,43 (1,75)	77		9,35 (10,86)	5,11 (13,59)	60 (77,9)			
<i>T. forsythia</i>	Salud y Gingivitis		48	2,33 (2,73)	0,00 (5,58)		48	3,84 (7,10)	0,00 (5,31)		21 (43,8)	0,939*
	Periodontitis I-II		53	1,72 (2,45)	0,00 (4,65)	0,335	53	0,89 (1,87)	0,00 (0,79)	0,160	18 (34,0)	1,000†
	Periodontitis III-IV		66	1,83 (2,47)	0,00 (4,81)		66	0,87 (1,77)	0,00 (1,02)		24 (36,4)	1,000‡
		España	90	1,40 (2,18)	0,00 (4,30)	<0,001§	90	0,57 (1,63)	0,00 (0,65)	<0,001§	27 (30,0)	0,026§
	Colombia	77	2,57 (2,78)	0,00 (5,60)	77		3,09 (5,79)	0,00 (3,70)	36 (46,8)			
<i>P. micra</i>	Salud y Gingivitis		48	1,77 (2,57)	0,00 (5,03)	0,503*	48	2,34 (6,27)	0,00 (2,41)	0,633*	16 (33,3)	1,000*
	Periodontitis I-II		53	1,19 (2,23)	0,00 (0,00)	0,275†	53	1,57 (4,12)	0,00 (0,00)	0,271†	12 (22,6)	0,225†
	Periodontitis III-IV		66	0,52 (1,55)	0,00 (0,00)	0,006‡	66	0,57 (2,54)	0,00 (0,00)	0,009‡	7 (10,6)	0,009‡
		España	90	0,42 (1,36)	0,00 (0,00)	<0,001§	90	0,28 (1,59)	0,00 (0,00)	<0,001§	8 (8,9)	<0,001§
	Colombia	77	1,88 (2,61)	0,00 (5,14)	77		2,70 (6,04)	0,00 (3,26)	27 (35,1)			
<i>F. nucleatum</i>	Salud y Gingivitis		48	4,48 (1,24)	4,69 (1,13)	0,111	48	3,63 (3,37)	2,58 (4,19)	0,951	46 (95,8)	0,822*
	Periodontitis I-II		53	4,52 (1,74)	5,04 (1,08)		53	4,66 (5,53)	2,45 (5,15)		47 (88,7)	1,000†
	Periodontitis III-IV		66	4,54 (1,91)	5,00 (1,14)		66	8,24 (13,55)	2,65 (9,20)		58 (87,9)	0,564‡
		España	90	4,16 (1,58)	4,60 (1,04)	<0,001§	90	2,58 (2,90)	1,95 (2,97)	<0,001§	81 (90,0)	0,842§
	Colombia	77	4,94 (1,71)	5,39 (1,19)	77		9,52 (12,57)	4,17 (9,06)	70 (90,9)			
<i>C. rectus</i>	Salud y Gingivitis		48	0,23 (0,91)	0,00 (0,00)		48	0,18 (0,88)	0,00 (0,00)		3 (6,3)	1,000*
	Periodontitis I-II		53	0,20 (1,03)	0,00 (0,00)	0,876	53	0,53 (3,42)	0,00 (0,00)	0,849	2 (3,8)	1,000†
	Periodontitis III-IV		66	0,20 (0,94)	0,00 (0,00)		66	0,07 (0,37)	0,00 (0,00)		3 (4,5)	1,000‡
		España	90	0,39 (1,28)	0,00 (0,00)	<0,001§	90	0,46 (2,70)	0,00 (0,00)	<0,001§	8 (8,9)	0,008§
	Colombia	77	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	77		0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0 (0,0)			
<i>E. corrodens</i>	Salud y Gingivitis		48	1,03 (1,89)	0,00 (2,25)	0,048*	48	0,35 (0,91)	0,00 (0,09)	0,039*	12 (25,0)	0,051*
	Periodontitis I-II		53	0,37 (1,18)	0,00 (0,00)	1,000†	53	0,07 (0,37)	0,00 (0,00)	1,000†	5 (9,4)	1,000†
	Periodontitis III-IV		66	0,47 (1,53)	0,00 (0,00)	0,074‡	66	0,45 (1,85)	0,00 (0,00)	0,066‡	6 (9,1)	0,033‡
		España	90	0,66 (1,53)	0,00 (0,00)	0,343§	90	0,19 (0,75)	0,00 (0,00)	0,355§	15 (16,7)	0,241§
	Colombia	77	0,53 (1,60)	0,00 (0,00)	77		0,43 (1,70)	0,00 (0,00)	8 (10,4)			
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Salud y Gingivitis		48	2,36 (2,74)	0,00 (5,43)		48	3,30 (6,31)	0,00 (4,24)		21 (43,8)	1,000*
	Periodontitis I-II		53	2,55 (2,77)	0,00 (5,30)	0,727	53	4,94 (11,23)	0,00 (4,47)	0,889	25 (47,2)	1,000†
	Periodontitis III-IV		66	2,31 (2,61)	0,00 (5,12)		66	4,14 (11,22)	0,00 (3,33)		30 (45,5)	1,000‡
		España	90	0,74 (1,68)	0,00 (0,00)	<0,001§	90	0,15 (0,63)	0,00 (0,00)	<0,001§	15 (16,7)	<0,001§
	Colombia	77	4,34 (2,31)	5,30 (1,39)	77		8,83 (13,34)	4,17 (9,34)	61 (79,2)			
<i>A. odontolyticus</i>	Salud y Gingivitis		48	2,24 (2,94)	0,00 (5,71)		48	6,95 (10,96)	0,00 (12,56)		18 (37,5)	1,000*
	Periodontitis I-II		53	2,14 (2,81)	0,00 (5,37)	0,374	53	5,82 (9,97)	0,00 (10,62)	0,278	20 (37,7)	0,399†
	Periodontitis III-IV		66	2,14 (2,81)	4,15 (5,63)		66	10,48 (17,67)	0,65 (16,12)		34 (51,5)	0,414‡
		España	90	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	<0,001§	90	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	<0,001§	0 (0,00)	<0,001§
	Colombia	77	5,35 (1,59)	5,69 (1,24)	77		17,33 (15,95)	13,87 (20,47)	72 (93,5)			

n, número de pacientes; n (%), número y porcentaje de muestras positivas. *, grupo de salud y gingivitis versus grupo de periodontitis I-II; †, grupo de periodontitis I-II versus grupo de periodontitis III-IV; ‡, grupo de salud y gingivitis versus grupo de periodontitis III-IV; §, España versus Colombia. a, test de Kruskal-Wallis y test de Mann-Whitney. b, Chi-cuadrado con corrección de Bonferroni.

Tabla S3. Media y desviación estándar (DE) y mediana y rango intercuartílico (RI) de recuentos (logarítmico transformado), proporciones y frecuencias de detección de especies bacterianas diana según país, en pacientes con periodontitis en estadios I-II. Los recuentos y proporciones se calcularon considerando todas las muestras.

Periodontitis I-II											
Especie	País	Conteos ^a				Proporciones ^a				Frecuencia ^a	
		n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n (%)	P valor
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	España	30	5,07 (1,20)	5,05 (0,92)	0,161	30	13,89 (18,78)	7,27 (14,33)	0,068	29 (96,7)	<0,001
	Colombia	23	2,95 (3,22)	0,00 (6,26)		23	15,45 (23,32)	0,00 (36,00)		11 (47,8)	
<i>Prevotella intermedia</i>	España	30	4,15 (1,41)	4,32 (1,57)	0,238	30	2,32 (4,16)	0,82 (2,34)	0,189	28 (93,3)	0,014
	Colombia	23	3,70 (2,79)	5,30 (5,78)		23	8,43 (11,19)	5,06 (12,50)		15 (65,2)	
<i>Tannerella forsythia</i>	España	30	1,39 (2,18)	0,00 (4,30)	0,184	30	0,39 (0,79)	0,00 (0,67)	0,251	9 (30,0)	0,487
	Colombia	23	2,15 (2,76)	0,00 (5,26)		23	1,54 (2,58)	0,00 (2,86)		9 (39,1)	
<i>Parvimonas micra</i>	España	30	0,32 (1,22)	0,00 (0,00)	0,001	30	0,49 (2,64)	0,00 (0,00)	0,002	2 (6,7)	0,002
	Colombia	23	2,32 (2,73)	0,00 (5,30)		23	2,96 (5,23)	0,00 (4,69)		10 (43,5)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	España	30	4,21 (1,75)	4,69 (0,98)	0,008	30	2,52 (2,86)	1,99 (3,02)	0,004	26 (86,7)	0,687
	Colombia	23	4,94 (1,68)	5,34 (1,12)		23	7,46 (6,85)	6,69 (9,70)		21 (91,3)	
<i>Campylobacter rectus</i>	España	30	0,35 (1,36)	0,00 (0,00)	0,211	30	0,94 (4,54)	0,00 (0,00)	0,211	2 (6,7)	0,499
	Colombia	23	0	0		23	0	0		0 (0,0)	
<i>Eikenella corrodens</i>	España	30	0,66 (1,51)	0,00 (0,00)	0,042	30	0,14 (0,48)	0,00 (0,00)	0,042	5 (16,7)	0,061
	Colombia	23	0	0		23	0	0		0 (0,0)	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	España	30	0,78 (1,80)	0,00 (0,00)	<0,001	30	0,13 (0,36)	0,00 (0,00)	<0,001	5 (16,7)	<0,001
	Colombia	23	4,85 (2,02)	5,47 (1,30)		23	11,21 (15,02)	6,12 (11,97)		20 (87,0)	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	España	30	0	0	<0,001	30	0	0	<0,001	0 (0,0)	<0,001
	Colombia	23	4,94 (2,07)	5,63 (1,34)		23	13,42 (11,32)	13,86 (16,80)		20 (87,0)	

n, número de pacientes; n (%), número y porcentaje de muestras positivas.

Tabla S4. Media y desviación estándar (DE) y mediana y rango intercuartílico (RI) de recuentos (logarítmico transformado), proporciones y frecuencias de detección de especies bacterianas diana según país, en pacientes con periodontitis en estadios III-IV. Los recuentos y proporciones se calcularon considerando todas las muestras.

Periodontitis III-IV											
Especie	País	Conteos ^a				Proporciones ^a				Frecuencia ^a	
		n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n (%)	P valor
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	España	30	5,34 (1,94)	5,97 (1,34)	<0,001	30	18,27 (17,98)	13,72 (25,91)	<0,001	27 (90,0)	<0,001
	Colombia	36	1,74 (2,69)	0,00 (5,00)		36	3,63 (7,38)	0,00 (3,70)		11 (30,6)	
<i>Prevotella intermedia</i>	España	30	4,27 (2,09)	5,00 (1,99)	0,736	30	5,09 (8,45)	1,65 (3,84)	0,263	25 (83,3)	0,410
	Colombia	36	4,09 (2,48)	5,20 (4,83)		36	8,87 (11,36)	3,53 (13,90)		27 (75,0)	
<i>Tannerella forsythia</i>	España	30	2,11 (2,48)	0,00 (4,68)	0,515	30	0,80 (1,73)	0,00 (0,89)	0,638	13 (43,3)	0,283
	Colombia	36	1,60 (2,47)	0,00 (4,94)		36	0,94 (1,81)	0,00 (1,21)		11 (30,6)	
<i>Parvimonas micra</i>	España	30	0,48 (1,48)	0,00 (0,00)	0,885	30	0,09 (0,37)	0,00 (0,00)	0,772	3 (10,0)	1,000
	Colombia	36	0,56 (1,63)	0,00 (0,00)		36	0,97 (3,39)	0,00 (0,00)		4 (11,1)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	España	30	4,25 (1,69)	4,77 (1,00)	0,012	30	1,68 (1,63)	0,99 (2,30)	<0,001	27 (90,0)	0,719
	Colombia	36	4,79 (2,07)	5,42 (1,29)		36	13,72 (1,47)	8,76 (21,59)		31 (86,1)	
<i>Campylobacter rectus</i>	España	30	0,45 (1,37)	0,00 (0,00)	0,054	30	0,17 (0,54)	0,00 (0,00)	0,054	3 (10,0)	0,089
	Colombia	36	0	0		36	0	0		0 (0,0)	
<i>Eikenella corrodens</i>	España	30	0,68 (1,79)	0,00 (0,00)	0,296	30	0,35 (1,18)	0,00 (0,00)	0,326	4 (13,3)	0,399
	Colombia	36	0,30 (1,27)	0,00 (0,00)		36	0,53 (2,28)	0,00 (0,00)		2 (5,6)	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	España	30	1,02 (1,90)	0,00 (0,90)	<0,001	30	0,10 (0,20)	0,00 (0,05)	<0,001	7 (23,3)	0,001
	Colombia	36	3,39 (2,65)	5,00 (5,42)		36	7,51 (14,42)	1,71 (8,54)		23 (63,9)	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	España	30	0	0	<0,001	30	0	0	<0,001	0 (0,0)	<0,001
	Colombia	36	5,31 (1,52)	5,60 (1,52)		36	19,23 (20,17)	11,40 (26,99)		34 (94,4)	

n, número de pacientes; n (%), número y porcentaje de muestras positivas.

Tabla S5. Media y desviación estándar (DE) y mediana y rango intercuartílico (RI) de recuentos (logarítmico transformado), proporciones y frecuencias de detección de especies bacterianas diana según país, en pacientes con periodontitis en salud y gingivitis. Los recuentos y proporciones se calcularon considerando todas las muestras.

Salud y Gingivitis											
Country	Conteos ^a				Proporciones ^a				Frecuencia ^b		
	n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n	Media (DE)	Mediana (RI)	P valor	n (%)	P valor	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	España	30	2,62 (2,61)	3,29 (5,42)	0,444	30	7,67 (14,42)	0,43 (10,28)	0,178	16 (53,3)	0,178
	Colombia	18	1,88 (2,76)	0,00 (5,63)		18	2,90 (6,56)	0,00 (2,28)		6 (33,3)	
<i>Prevotella intermedia</i>	España	30	2,26 (2,24)	2,23 (4,00)	<0,001	30	2,05 (5,55)	0,03 (0,72)	<0,001	17 (56,7)	0,001
	Colombia	18	5,68 (0,81)	5,77 (1,18)		18	11,47 (9,64)	7,61 (12,89)		18 (100,0)	
<i>Tannerella forsythia</i>	España	30	0,72 (1,65)	0,00 (0,00)	<0,001	30	0,52 (2,12)	0,00 (0,00)	<0,001	5 (16,7)	<0,001
	Colombia	18	5,03 (1,92)	5,77 (0,88)		18	9,38 (8,94)	6,75 (12,74)		16 (88,9)	
<i>Parvimonas micra</i>	España	30	0,45 (1,41)	0,00 (0,00)	<0,001	30	0,24 (0,79)	0,00 (0,00)	<0,001	3 (10,0)	<0,001
	Colombia	18	3,97 (2,59)	5,26 (5,79)		18	5,84 (9,33)	3,35 (5,89)		13 (72,2)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	España	30	4,03 (1,29)	4,25 (1,03)	<0,001	30	3,54 (3,63)	2,39 (3,40)	0,443	28 (93,3)	0,521
	Colombia	18	5,23 (0,65)	5,25 (0,91)		18	3,78 (2,99)	2,73 (5,05)		18 (100)	
<i>Campylobacter rectus</i>	España	30	0,37 (1,14)	0,00 (0,00)	0,171	30	0,29 (1,11)	0,00 (0,00)	0,171	3 (10,0)	0,282
	Colombia	18	0	0		18	0	0		0 (0,0)	
<i>Eikenella corrodens</i>	España	30	0,64 (1,31)	0,00 (0,00)	0,134	30	0,08 (0,23)	0,00 (0,00)	0,138	6 (20,0)	0,325
	Colombia	18	1,69 (2,49)	0,00 (4,68)		18	0,80 (1,37)	0,00 (1,51)		6 (33,3)	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	España	30	0,42 (1,28)	0,00 (0,00)	<0,001	30	0,23 (1,02)	0,00 (0,00)	<0,001	3 (10,0)	<0,001
	Colombia	18	5,59 (0,49)	5,59 (0,78)		18	8,42 (8,00)	5,06 (7,39)		18 (100,0)	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	España	30	0	0	<0,001	30	0	0	<0,001	0 (0,00)	<0,001
	Colombia	18	5,97 (0,60)	5,99 (0,95)		18	18,54 (10,23)	21,21 (15,54)		18 (100,0)	

n, número de pacientes; n (%), número y porcentaje de muestras positivas.

3.5. Impacto del estado periodontal, país, tabaquismo y edad.

Los resultados de los análisis de regresión logística binaria se presentan en la Tabla 9 (solo para especies que muestran un modelo confiable). En toda la cohorte, ajustada por país, tabaquismo, estado periodontal y edad, *P. gingivalis* se asoció significativamente con sujetos españoles (OR = 10,48, IC 95% [4,59; 23,89], $p < 0,001$) en periodontitis en estadios I-II (OR = 8,43, IC del 95% [2,93; 24,19], $p < 0,001$) y periodontitis en estadios III-IV (OR = 3,44, IC del 95% [1,35; 8,78], $p = 0,010$). Esta mayor probabilidad de ser detectada en España se muestra en el análisis por estratos de edad, aunque la probabilidad de que se detecte *P. gingivalis* en sujetos de 51 a 60 años es mayor en los grupos de periodontitis que en el grupo de salud/gingivitis. Por el contrario, *P. micra* se asoció significativamente con sujetos colombianos (OR = 8,32, IC del 95% [3,23; 21,45], $p < 0,001$) en salud/gingivitis (OR = 7,68, IC del 95% [2,53; 23,32], $p < 0,001$) y en periodontitis en estadios I-II (OR = 3,41; IC del 95%

[1,15; 10,05], $p=0,026$). Además, la probabilidad de detección de *P. micra* aumentó en el rango de 30 a 40 años para los sujetos colombianos (OR = 10,58, IC del 95% [2,33; 48,04], $p=0,002$) con salud/gingivitis (OR = 18,10, IC del 95% [2,39; 137,02], $p=0,005$) y con periodontitis en estadios I-II (OR = 7,91, IC del 95% [1,25; 49,71], $p=0,027$). *Capnocytophaga* spp. también tuvo una mayor probabilidad de ser detectado en Colombia (OR = 19,0, IC 95% [8,72; 41,63], $p<0,001$), y esta probabilidad se mantuvo en todos los estratos de edad.

Tabla 9. Análisis de regresión logística escalonada hacia adelante que evalúan la detección de especies bacterianas seleccionadas considerando país, tabaquismo, estado periodontal y edad como covariables en una primera comparación con toda la cohorte y en una segunda comparación estratificada por rangos de edad.

	Modelo Ajustado		Coeficiente	p valor	OR	95% IC		
	Toda la cohorte	Estratificación por año y rangos						
<i>P. gingivalis</i>	España		2,35	<0,001	10,48	4,59	23,89	
	Periodontitis I-II		2,13	<0,001	8,43	2,93	24,19	
	Periodontitis III-IV		1,23	0,010	3,44	1,35	8,78	
		30-40 años	España	2,02	0,001	7,60	2,34	24,67
		41-50 años	España	1,91	0,002	6,80	2,07	22,29
		51-60 años	España	2,52	0,003	12,4	2,36	65,45
			Periodontitis I-II	2,69	0,010	14,7	1,90	114,05
			Periodontitis III-IV	2,08	0,027	8,01	1,26	50,83
<i>P. micra</i>	Colombia		2,12	<0,001	8,32	3,23	21,45	
	Salud y gingivitis		2,03	<0,001	7,68	2,53	23,32	
	Periodontitis I-II		1,22	0,026	3,41	1,15	10,05	
		30-40 años	Colombia	2,35	0,002	10,58	2,33	48,04
			Salud y gingivitis	2,89	0,005	18,1	2,39	137,02
		Periodontitis I-II	2,06	0,027	7,91	1,25	49,71	
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Colombia		2,94	<0,001	19,0	8,72	41,63	
		30-40 años	Colombia	3,44	<0,001	31,2	7,50	130,17
		41-50 años	Colombia	2,07	0,001	8,00	2,40	26,56
		51-60 años	Colombia	3,66	<0,001	39,0	7,72	195,71

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.

Estudio #2:

**CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL EN PACIENTES CON
DIFERENTES ESTADIOS DE PERIODONTITIS EN
ESPAÑA Y COLOMBIA.**

Población de estudio.

La muestra final, en relación con las muestras analizadas siguiendo el enfoque descrito, estuvo formada por 60 pacientes (España n = 30 y Colombia n = 30): 10 y 10, respectivamente, con salud periodontal/gingivitis; 10 y 10, respectivamente, con periodontitis en estadios I-II; y 10 y 10, respectivamente, con periodontitis en estadios III-IV. En cada grupo se consideraron dos rangos de edad: 30-40 y de 41-65 años con una diferencia máxima de 4 años, con 5 pacientes para cada rango por país (Figura 6).

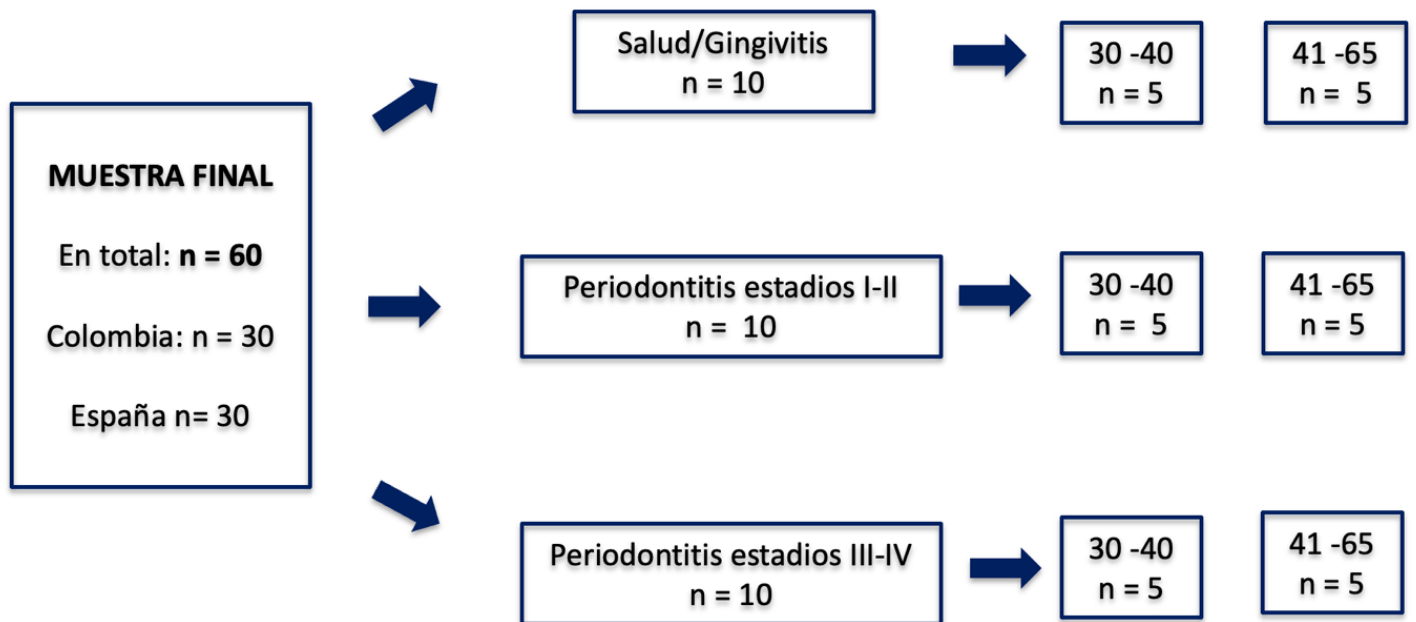


Figura 6. Muestra final y distribución de pacientes según estado periodontal y edad.

En cuando a las variables sociodemográficas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según su estado periodontal, ni entre países ($p < 0,05$) (Tabla 10).

Tabla 10. Características Sociodemográficas por país y estado periodontal.

	ESTADO PERIODONTAL			Diferencia entre grupos	Diferencia entre países
	Salud y Gingivitis	Periodontitis I-II	Periodontitis III-IV	p valor	p valor
País					
Colombia	10	10	10	1	NS
España	10	10	10		
Edad [media (DE)]					
Colombia	44,7 (12)	40 (9)	42,3 (7)	0,99	NS
España	41,1 (9,6)	45 (6,9)	43,8 (7,8)		
Género					
femenino/Masculino [n (%)]					
Colombia	7/3 (23/10)	6/4 (20/13)	5/5 (17/17)	1	NS
España	7/3 (23/10)	6/4 (20/13)	5/5 (17/17)		

NS= No hay diferencias significativas $p > 0,05$.

Variables de resultado clínico.

De manera general, y como era esperable, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estado/condiciones periodontales, para todas las características clínicas ($p < 0,05$), excepto para el índice de placa (PII) que fue similar en ambos grupos de periodontitis ($p = 0,52$) (Tabla 3). Entre ambas poblaciones se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a las características clínicas, observándose una media mayor en el PII en Colombia para el grupo de estadios I-II al compararlo con salud/gingivitis ($p = 0,02$), y en el sangrado al sondaje (BoP) en España para el grupo de estadios III-IV al compararlo igualmente con el grupo de salud/gingivitis ($p = 0,05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Características Clínicas por país y estado periodontal.

	ESTADO PERIODONTAL			<i>Diferencia entre grupos</i>	<i>Diferencia entre países</i>
	Salud y Gingivitis	Periodontitis I-II	Periodontitis III-IV	<i>p valor</i>	<i>p valor</i>
Índice de Placa PII					
Median IQR					
Colombia	19 (12-33)	98 (25-100)	66 (60-100)	¥0,010	
España	53 (13-38)	78(4-85)	79 (48-100)	^a 0,030	^a 0,02
				^b 0,005	^b NS
				^c 0,520	^c NS
Sangrado al sondaje BoP					
Median IQR					
Colombia	8 (4-13)	100 (46-100)	66 (1-60)	¥0,0001	
España	16 (2-27)	45(19-55)	79 (1-48)	^a 0,0007	^a NS
				^b 0,0001	^b 0,05
				^c 0,0291	^c NS
Profundidad de la Bolsa PD					
Colombia	2,35 (2,13-2,65)	3,22 (2,9-4)	3,83 (3,4-4,7)	¥0,0001	
España	2,32 (2,1 -2,6)	3,21 (2,71-3,46)	3,74 (3,4-4,3)	^a 0,0001	^a NS
				^b 0,0001	^b NS
				^c 0,0018	^c NS
Nivel de Inserción Clínico CAL					
Colombia	2,40 (2,1-2,7)	2,6 (2,5-3,86)	4,19(3,3-4,8)	¥0,0001	
España	2,3 (2,1-2,6)	3,4 (3,1-3,6)	4,29 (3,8-5,3)	^a 0,0001	^a NS
				^b 0,0001	^b NS
				^c 0,0004	^c NS

¥ Diferencia entre los estadios. a = Diferencias entre salud/gingivitis y periodontitis estadio I-II. b = Diferencias entre salud/gingivitis y periodontitis estadio III-IV. c = Diferencias entre periodontitis estadio I-II y periodontitis estadio III-IV. NS= No hay diferencias significativas $p > 0.05$.

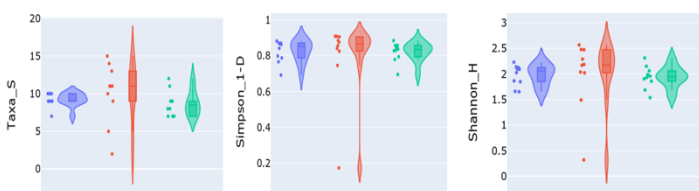
Composición Taxonómica del Microbioma subgingival de España y Colombia.

Se realizaron 85,864 lecturas procesadas, y se ajustaron las ASVs para que fueran asignadas a nivel de especie, obteniendo 93 especies.

Comparación de la Composición Taxonómica del Microbioma subgingival entre España y Colombia según los estados periodontales.

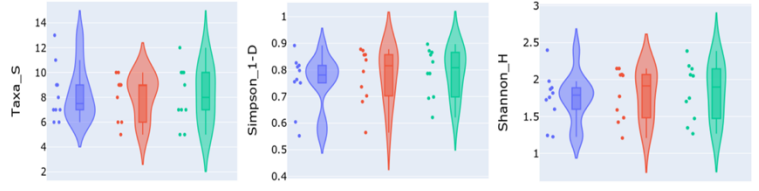
Diversidad alfa.

A pesar de que los resultados de alfa diversidad no fueron estadísticamente significativos para las comparaciones de estados periodontales en las poblaciones de estudio, se observó mayor riqueza de especies en general en los pacientes colombianos al compararlos con los pacientes españoles. Adicionalmente, la diversidad fue mayor para los grupos de periodontitis estadios I-II comparados con los grupos de salud/gingivitis, sobre todo en Colombia. En los grupos de periodontitis III-IV de ambas poblaciones, la diversidad tendió a disminuir con respecto a los de estadios I-II (Figuras 7 y 8). Para los grados de periodontitis los resultados de alfa diversidad tampoco fueron estadísticamente significativos. Aún así, en el grado C se observó mayor riqueza de especies y mayor diversidad alfa en Colombia, en comparación con España (Tablas 12 y 13).



Estadio	Salud&Gingivitis n= 10			Periodontitis_I-II n= 10		
	Riqueza	Simpson	Shannon	Riqueza	Simpson	Shannon
Salud&Gingivitis n= 10						
Periodontitis_I-II	0,22	0,6	0,7			
Periodontitis_III-IV	0,13	0,22	0,1	0,1	0,32	0,2

Figura 7. Comparaciones de alfa diversidad entre estados periodontales en España (especie).



Estadio	Salud&Gingivitis n= 10			Periodontitis_I-II n= 10		
	Riqueza	Simpson	Shannon	Riqueza	Simpson	Shannon
Salud&Gingivitis n= 10						
Periodontitis_I-II	0,82	0,9	0,88			
Periodontitis_III-IV	0,9	0,3	0,54	0,9	0,6	0,65

Figura 8. Comparaciones de alfa diversidad entre estados periodontales en Colombia (especie).

España	Grado A-B n= 9			
		Riqueza	Simpson	Shannon
	Grado C n= 11	0,051	0,1	0,1

Tabla 12. Comparaciones de alfa diversidad entre grados en España (especie).

Colombia	Grado A-B n= 9			
		Riqueza	Simpson	Shannon
	Grado C n= 11	0,34	0,9	0,67

Tabla 13. Comparaciones de alfa diversidad entre grados en Colombia (especie).

Abundancia Relativa.

Los hallazgos microbiológicos entre países mostraron que, para ambas poblaciones y para todos los grupos de periodontitis, las especies con mayor Abundancia Relativa significativa fueron en primer lugar *Fusobacterium* (*Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT 203), seguidos (en ese orden) de *Filifactor alocis*, Taxones sin asignación, *Peptostreptococcaceae [XI][G-9][Eubacterium]_brachy* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041. *Streptococcus mitis* fue la especie con mayor Abundancia Relativa en los grupos de salud/gingivitis (Figura 9).

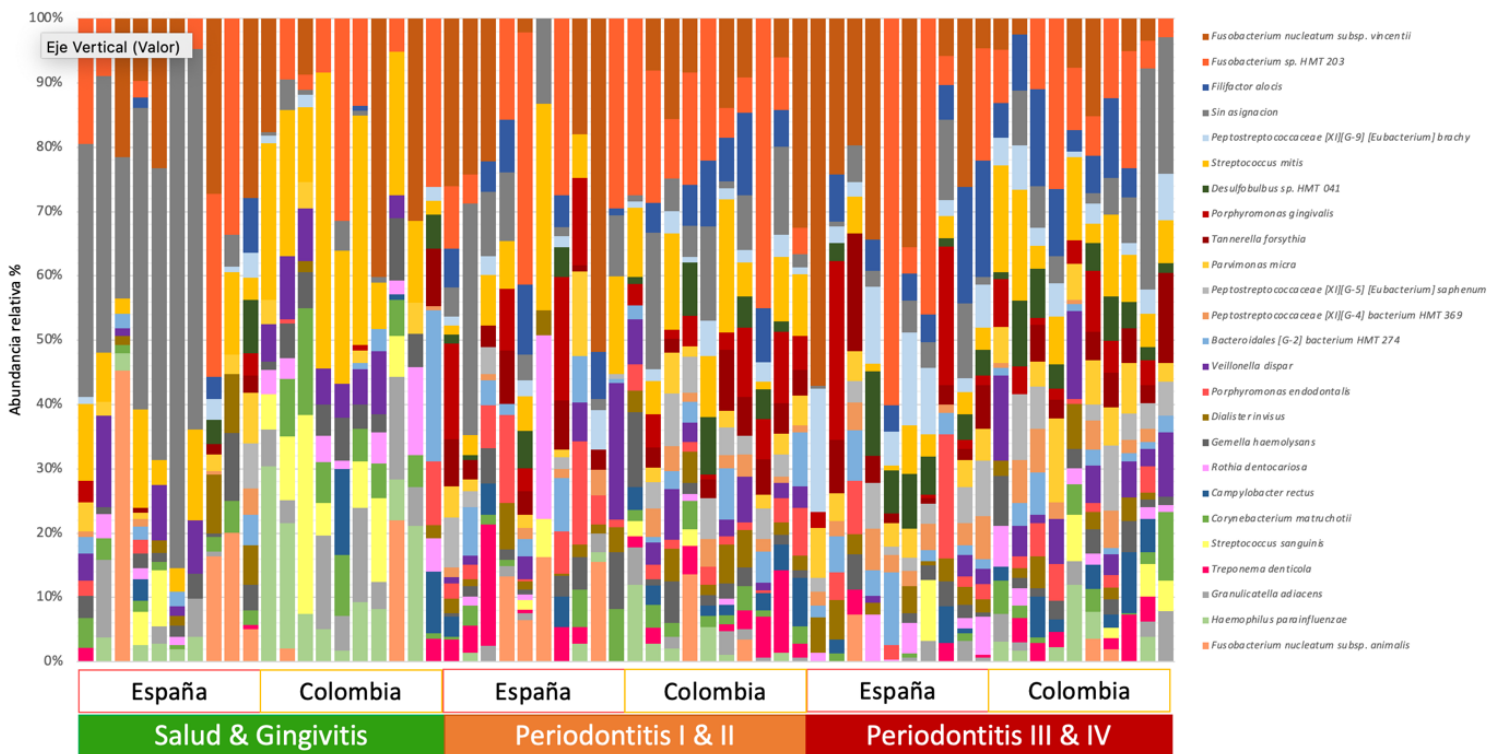


Figura 9. Abundancia Relativa de los principales microorganismos identificados en muestras de España y Colombia para todos los grupos de estados periodontales.

Composición de especies – Proporción.

Al comparar periodontitis en estadios I-II y salud/gingivitis en cada país, las especies con mayores proporciones en la periodontitis estadios I-II de los españoles (en ese orden de proporción) fueron *Porphyromonas endodontalis* ($p=0,013$), *T. forsythia* ($p=0,019$) (Figura 10), a diferencia de las mayores proporciones en los pacientes colombianos en ese orden de proporción) principalmente de Taxones sin asignación ($p=0,038$), *F. alocis* ($p<0,001$), *P. gingivalis* ($p<0,001$), *Peptostreptococcaceae [XI][G-5][Eubacterium] saphenum* ($p<0,001$), *Treponema denticola* ($p=0,040$), *Dialister invisus* ($p<0,001$), *Lachnospiraceae [G-8] bacterium HMT 500* ($p=0,018$), *Peptostreptococcaceae [XI][G-4] bacterium HMT 369* ($p<0,001$), *Peptoniphilaceae [G-1] bacterium HMT 113* ($p<0,001$), *Selenomonas sputigen* ($p=0,015$) y *Peptostreptococcaceae [XI][G-9][Eubacterium] brachy* ($p=0,025$) (Figura 11). Las mayores proporciones en los grupos de salud/gingivitis en comparación con los de periodontitis en estadios I-II, en España (en ese orden de proporción) fueron para Taxones sin asignación ($p=0,012$), *Streptococcus intermedius* ($p=0,031$) y *Haemophilus parainfluenzae* ($p=0,014$) (Figura 10), en contraste con las mayores proporciones (en ese orden de proporción) de *Streptococcus mitis* ($p=0,025$), *Haemophilus parainfluenzae* ($p=0,048$), *Streptococcus sanguinis* ($p=0,022$), *Granulicatella adiacens* ($p=0,015$), *Rothia dentocariosa* ($p=0,014$), *Corynebacterium matruchotii* ($p=0,021$), *Leptotrichia hongkongensis* ($p=0,045$), *Rothia aeria* ($p=0,048$), *Bergeyella* sp. ($p=0,027$), en Colombia (Figura 11).

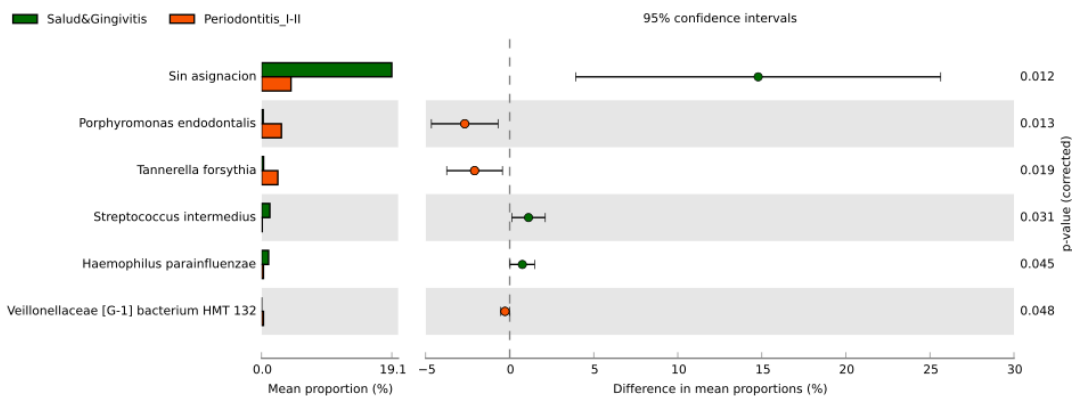


Figura 10. Comparaciones de composición de especies en España entre salud/gingivitis y periodontitis I-II.

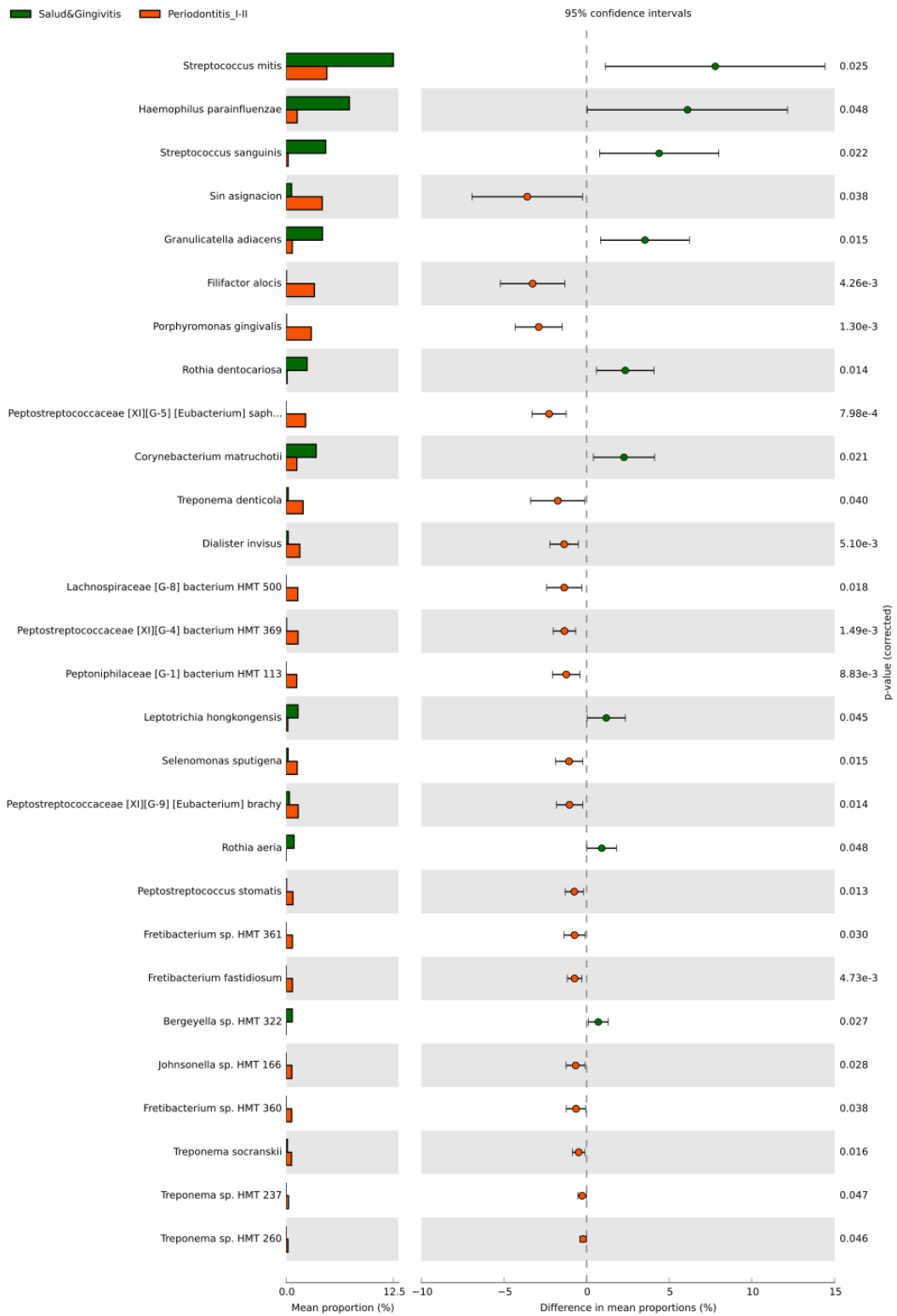


Figura 11. Comparaciones de composición de especies en Colombia entre salud/gingivitis y periodontitis I-II.

Para los grupos de periodontitis III-IV en comparación con los de salud/gingivitis, ambas poblaciones evidenciaron mayores proporciones de *Filifactor alocis* (España ($p=0,022$); Colombia ($p<0,001$)) y de *Desulfobulbus* sp. HMT 041 (España ($p=0,027$); Colombia ($p<0,001$)) para periodontitis III-IV. También se observaron mayores proporciones para los grupos de periodontitis III-IV en comparación con los grupos de sanos/gingivitis en España (en ese orden de proporción) de *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]_{brachy} ($p<0,001$), *T. forsythia* ($p=0,041$), *Bacteroidales* [G-2] bacterium HMT 274 ($p=0,049$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369 ($p<0,001$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5][*Eubacterium*] *saphenum* ($p=0,018$), *Mogibacterium timidum* ($p<0,001$) (Figura 12), en contraste con las mayores proporciones en Colombia (en ese orden de proporción) de Taxones sin asignación ($p=0,047$), *P. gingivalis* ($p=0,024$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5][*Eubacterium*] *saphenum* ($p=0,022$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369 ($p<0,001$), *Treponema denticola* ($p=0,028$), *Lachnospiraceae* [G-8] bacterium HMT 500 ($p<0,001$), *Fretibacterium* sp. HMT 361 ($p=0,016$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*] *brachy* ($p=0,023$), *Dialister invisus* ($p<0,001$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-6][*Eubacterium*] *nodatum* ($p=0,015$) (Figura 13).

Las mayores proporciones para los grupos de salud/gingivitis en comparación con los grupos de periodontitis estadios III-IV, estuvieron dominadas en ambos países entre otras por *Corynebacterium matruchotii* (España ($p<0,001$); Colombia ($p=0,013$)), y además por (en ese orden de proporción) Taxones sin asignación ($p<0,001$), *Haemophilus parainfluenzae* ($p<0,001$), *Escherichia coli* ($p<0,001$) en España (Figura 12), a diferencia de las mayores proporciones en Colombia (en ese orden de proporción) de *Streptococcus mitis* ($p=0,037$), *Streptococcus sanguinis* ($p=0,043$), *Granulicatella adiacens* ($p=0,014$), *Leptotrichia hongkongensis* ($p<0,001$) y *Bergeyella* sp. ($p=0,033$) (Figura 13).

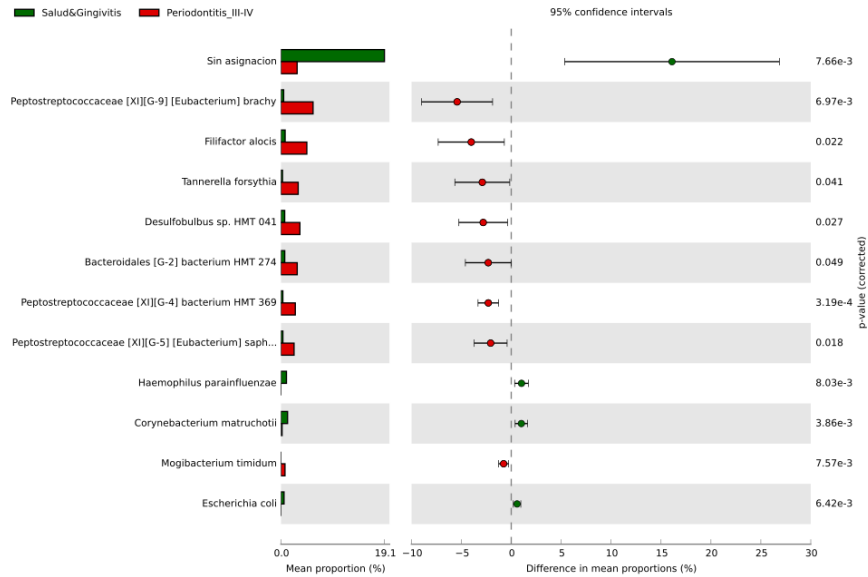


Figura 12. Comparaciones de composición de especies en España entre salud/gingivitis y periodontitis III-IV.

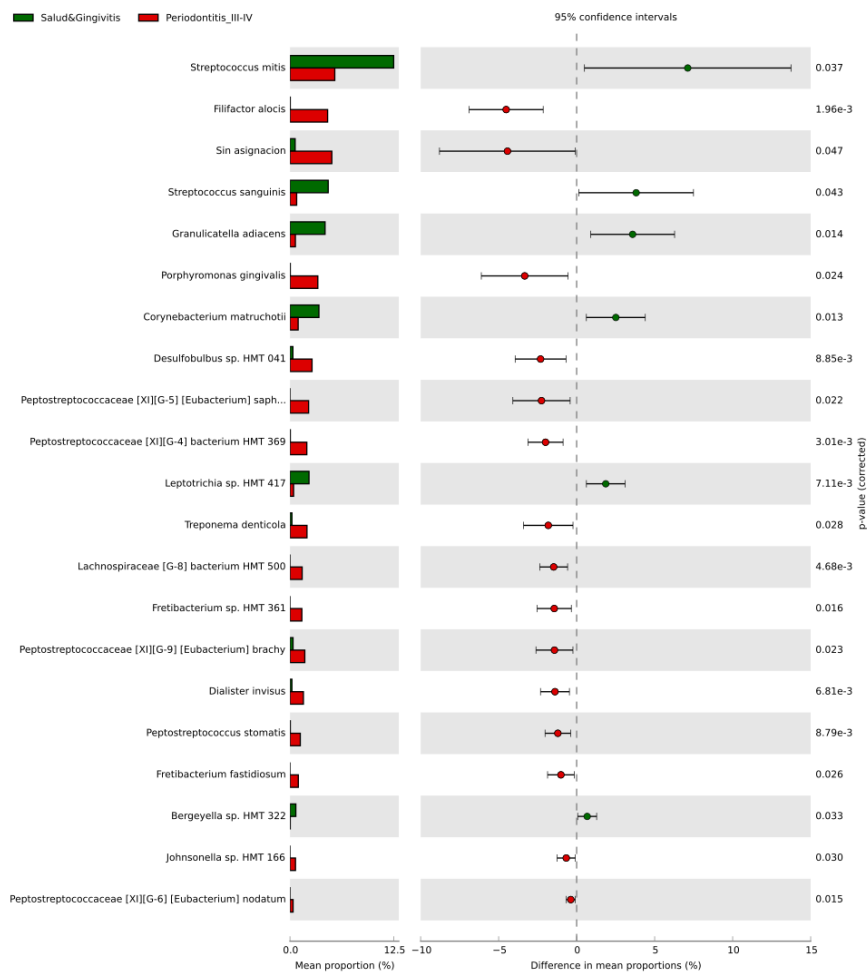


Figura 13. Comparaciones de composición de especies en Colombia entre salud/gingivitis y periodontitis III-IV.

Al comparar los grupos de periodontitis I-II y de periodontitis III-IV en cada país, en España se evidenciaron mayores proporciones de especies en los grupos de periodontitis III-IV, en comparación con Colombia, donde las mayores proporciones estuvieron presentes en el grupo de periodontitis estadios I-II. Entre estas especies en España estuvieron (en ese orden de proporción) *Peptostreptococcaceae [XI][G-9][Eubacterium]_brachy* ($p=0,011$), *Desulfobulbus* sp. HMT 041 ($p=0,041$), *Peptostreptococcaceae [XI][G-4] bacterium* HMT 369 ($p<0,001$) (Figura 17). Solo *Prevotella nigrescens* ($p=0,041$) mostró mayores proporciones en las periodontitis estadios I-II de los españoles (Figura 14). Las mayores proporciones de especies en Colombia para los grupos de periodontitis estadios I-II en comparación con los de estadios III-IV fueron (en ese orden de proporción) para *Leptotrichia* sp. HMT 417 ($p=0,030$) y para *Campylobacter gracilis* ($p=0,045$) (Figura 15).

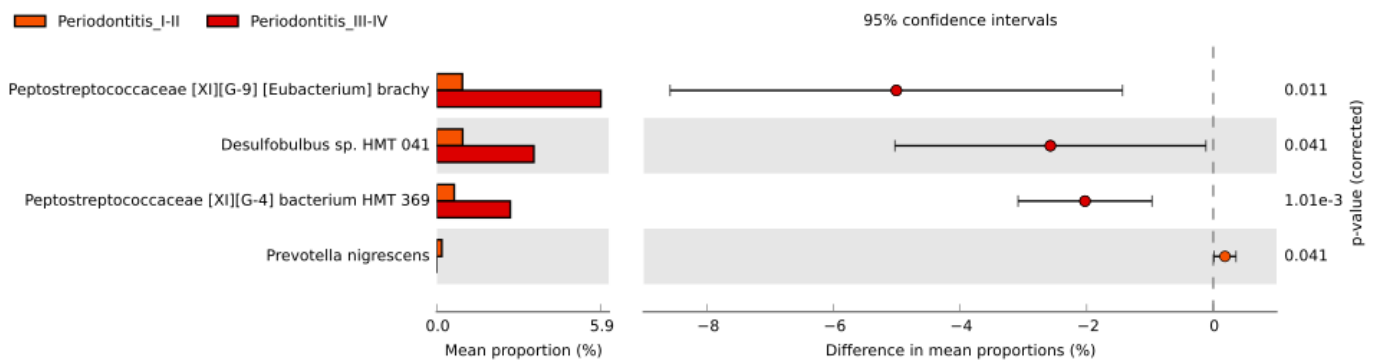


Figura 14. Comparaciones de composición de especies en España entre periodontitis I-II y periodontitis III-IV.

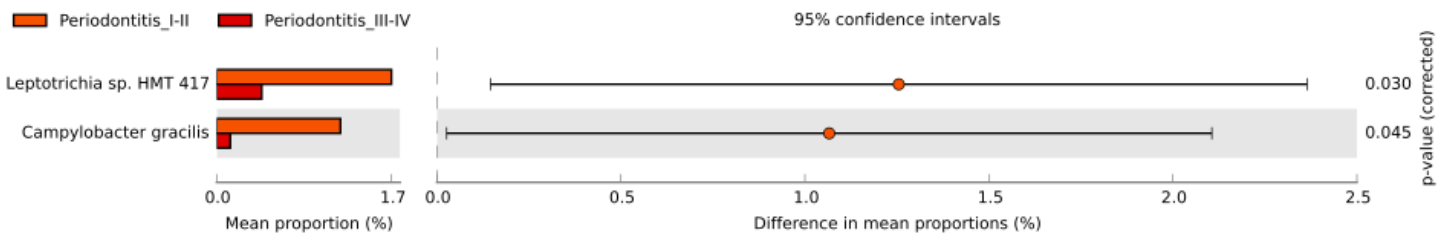


Figura 15. Comparaciones de composición de especies en Colombia entre periodontitis I-II y periodontitis III-IV.

Se tuvieron en cuenta dos grupos de grados de periodontitis: Grados A-B (n= 18) y Grado C (n= 22). Veinte muestras no aplicaron en esta clasificación (debido a que correspondían a los grupos de sanos/gingivitis). Ambos países mostraron una mayor proporción de especies para el grado C al compararlo con los grados A y B, pero con una proporción significativamente mayor de *Desulfobulbus* sp. HMT 041 ($p < 0,001$), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy* ($p = 0,019$) en España, en contraste con *Filifactor alocis* ($p < 0,001$) en Colombia (Figuras 16 y 17).

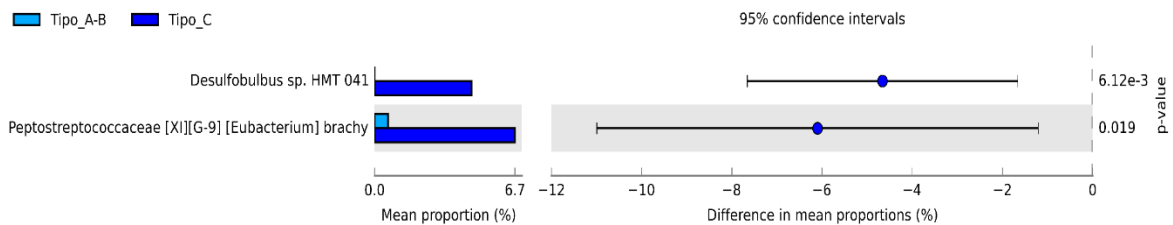


Figura 16. Comparaciones de composición de especies en España entre los grados A-B y el grado C.

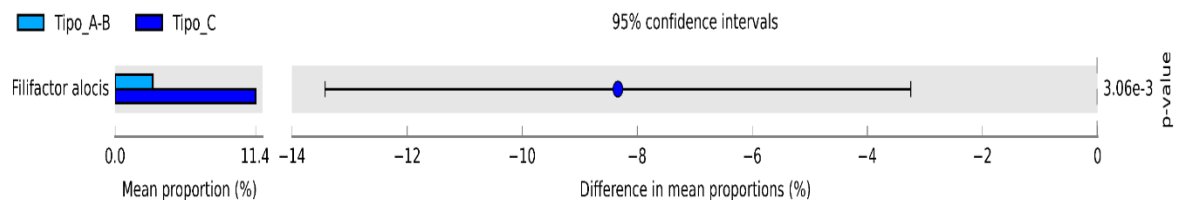


Figura 17. Comparaciones de composición de especies en Colombia entre los grados A-B y el grado C.

8. DISCUSIÓN

A magnifying glass icon with a dark grey handle and frame, focusing on the word 'DISCUSIÓN'. The word 'DISCUSIÓN' is written in a dark blue, serif font. The magnifying glass is positioned over the word, with the lens centered on the 'IÓ' part of the word.

Los dos análisis realizados sobre un estudio de corte transversal, llevados a cabo en la presente tesis, mostraron diferencias en el microbioma subgingival entre ambas poblaciones, y para todos los estados periodontales. Con el uso del cultivo se evidenciaron recuentos y niveles más altos de *P. gingivalis* en periodontitis, en comparación con niveles más altos de *E. corrodens* y *P. micra* en salud/gingivitis. En adición, se observaron menores diferencias al comparar los estadios de la periodontitis. En cuanto a los países, Colombia presentó recuentos totales más altos y una mayor variabilidad bacteriana en comparación con España. Utilizando técnicas de secuenciación del gen ARNr 16S, a pesar de que los resultados no fueron significativos, la riqueza y la diversidad de especies fue ligeramente mayor en Colombia en comparación con España. Además, se observó mayor abundancia relativa de *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT 203, *Filifactor alocis*, Taxones sin asignación, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041 en periodontitis, en comparación con la mayor abundancia relativa de *Streptococcus mitis* en salud/gingivitis. Las especies no cultivables o difícilmente cultivables dominaron el microbioma periodontal de las poblaciones, y discriminaron entre los estadios y grados de periodontitis para ambos países, con mayores proporciones de especies para los estadios más avanzados en España y en los estadios menos avanzados en Colombia.

ESTUDIO #1:

Este estudio reveló diferencias en la microbiota subgingival entre pacientes con periodontitis (recuentos y niveles más altos de *P. gingivalis*) y sujetos sanos/gingivitis (niveles más altos de *E. corrodens* y *P. micra*), mientras que se observaron diferencias menores al comparar los distintos estadios de la periodontitis. Por el contrario, se detectaron diferencias relevantes al comparar sujetos de diferentes países, siendo los pacientes colombianos los que presentaban recuentos totales más altos y una mayor variabilidad bacteriana que los pacientes españoles.

A pesar de las diferencias en términos de tabaquismo, también reportadas en estudios previos (Herrera y col., 2008), las poblaciones estudiadas fueron comparables. A pesar de esto, no se puede descartar el impacto del tabaquismo en los resultados microbiológicos del presente estudio, ya que el impacto del tabaquismo en la periodontitis ha sido claramente establecido (Eke y col., 2016), y también puede influir en la composición de la microbiota subgingival (van Winkelhoff y col., 2002 a).

Las poblaciones seleccionadas también fueron comparables, ya que fueron similares en términos de porcentaje de bolsas periodontales y otras variables clínicas. Todos los parámetros mostraron, como se esperaba, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estado periodontal. Sin embargo, en Colombia se evidenciaron niveles más altos de BoP, específicamente en periodontitis en estadios I-II y III-IV, y mayor PD en periodontitis en estadios I-II. Por el contrario, los niveles de placa fueron más altos en España en el grupo de salud/gingivitis. Como en estudios anteriores, los pacientes colombianos tendían a presentar hallazgos clínicos más graves, con niveles más bajos de placa (Herrera y col., 2008). Se ha sugerido que, en pacientes colombianos, niveles bajos de placa en bolsas profundas pueden desencadenar niveles altos de inflamación (Botero y col., 2007), que puede estar condicionado por condiciones específicas del estilo de vida en los países en desarrollo (Contreras y col., 2015) o por un trasfondo genético específico en estos pacientes (Loos y col., 2005).

En general, la microbiota subgingival demostró diferencias entre sujetos con salud/gingivitis (mayor prevalencia de *E. corrodens* y *P. micra*) y periodontitis (mayor prevalencia de *P. gingivalis*). Si bien el papel patógeno de *P. gingivalis* ha sido claramente establecido como especie bacteriana fuertemente asociada con periodontitis (van Winkelhoff y col., 2002 b), los hallazgos para *E. corrodens* y *P. micra* son inesperados, especialmente para *P. micra*, que también se ha considerado como un patógeno periodontal con una asociación moderada con periodontitis (van Winkelhoff y col., 2002 b; Rams y col., 1992; Kremer y col., 2000; van Dalen y col., 1998).

La microbiota subgingival mostró claras diferencias al comparar países: Colombia, además de presentar recuentos totales superiores a España, también mostró recuentos,

proporciones y frecuencia de detección significativamente mayores de *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp., *A. odontolyticus* y *P. intermedia*; por el contrario, en España se encontraron recuentos, proporciones y frecuencia de detección significativamente más altos de *P. gingivalis* y *C. rectus*. Los sujetos colombianos albergaron mayor prevalencia de *P. micra* en salud/gingivitis y en periodontitis estadios I-II, mientras que en España, se observaron mayores frecuencias de detección de *P. gingivalis* en periodontitis estadios I-II y III-IV. Al considerar también el rango de edad, *P. micra* mostró una asociación más fuerte con los pacientes colombianos en los grupos de salud/gingivitis y periodontitis estadios I-II entre 30 y 40 años de edad. Estos hallazgos sugieren que la microbiota de los sujetos colombianos se caracteriza por un mayor recuento bacteriano y una mayor variabilidad, mientras que se observó un papel relevante de *P. gingivalis* en la periodontitis en pacientes españoles, de acuerdo con estudios previos (Sanz y col., 2000; Herrera y col., 2008). Una posible hipótesis puede sugerir que, en sujetos colombianos, las biopelículas disbióticas podrían estar asociadas con mayores cantidades y mayor variedad en la microbiota en edades específicas (Hajishengallis y col., 2014) mientras que en España el impacto de patógenos clave podría ser más relevante (Lamont y col., 2018; Hajishengallis y col., 2020) independientemente de la edad.

Las diferencias detectadas en la microbiota periodontal entre países, según el estado periodontal, podrían estar relacionadas con la influencia de características específicas de diferentes poblaciones geográficas en la composición bacteriana (Herrera y col., 2008; Botero y col., 2007; Sanz y col., 2000; Lafaurie y col., 2007; Mayorga-fayad y col., 2007). Además, la clasificación de periodontitis de 2018 no incluye diferentes tipos de periodontitis, sino una única entidad multidimensional (Tonetti y col., 2018), que podría estar asociada con diferentes perfiles microbianos al comparar poblaciones.

El presente estudio ha utilizado técnicas de cultivo para evaluar la microbiota subgingival. Como se explicó anteriormente, el uso exclusivo de técnicas moleculares podría resultar en datos incompletos sobre la diversidad microbiana y, por lo tanto, es importante tener bases de datos de cultivos paralelas (Donachie y col., 2007; Teles y col., 2013). Además, con la introducción de procedimientos de incubación y manipulación anaeróbicos más

competentes, el cultivo se reinventa todos los días (Contreras y col, 2015) y todavía puede considerarse una herramienta relevante en la caracterización de patógenos periodontales (Tanner, 2015; van Winkelhoff y col., 2016; Vartoukian y col., 2016). El cultivo microbiológico no está exento de limitaciones (Teles y col., 2013; Tanner, 2015) pero sigue siendo el estándar de oro para la identificación bacteriana y el punto de partida para los análisis moleculares actuales limitaciones (Teles y col., 2013; Tanner, 2015). Sin embargo, el cultivo bacteriano no es capaz de identificar algunos segmentos de la microbiota.

ESTUDIO #2:

El presente estudio basado en un estudio de corte transversal, las especies con mayor Abundancia Relativa en las poblaciones de estudio fueron (en ese orden) *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT 203, *Filifactor alocis*, Taxones sin asignación, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041, para todos los grupos de periodontitis, y *Streptococcus mitis* para salud/gingivitis. Las especies no cultivables o difícilmente cultivables, fueron preponderantes al comparar los estados periodontales y los grados de periodontitis para ambos países, evidenciando mayores proporciones de especies para los estadios más avanzados en España y para los estadios menos avanzados en Colombia. A pesar de que no se evidenciaron diferencias significativas, en general, la riqueza de especies fue mayor en Colombia en comparación con España, la diversidad alfa fue mayor para los grupos de estadios I-II, tendiendo a la baja en los grupos de estadios III-IV para ambas poblaciones, y el grado C evidenció una mayor riqueza de especies y diversidad alfa, sobre todo en Colombia.

Las muestras seleccionadas en el presente estudio fueron comparables ya que presentaron similitudes en cuanto a características sociodemográficas y variables clínicas. La mayoría de estos parámetros clínicos, como se esperaba, mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos de estados periodontales en general. Solo el PII no mostró diferencias entre los estadios de la periodontitis. Además, en cuanto a las comparaciones entre países, en Colombia se evidenciaron niveles levemente más altos de

PII en la periodontitis en estadios III-IV, y en España se evidenciaron niveles levemente más altos de BoP en la periodontitis en estadios III-IV. Según se ve, las variaciones en el índice de placa (levemente aumentado en Colombia con respecto a España), no parecieron ser suficientes para influir en las características inflamatorias de ambos países. Estos resultados podrían sugerir la hipótesis de que independientemente del PII, el microbioma patógeno puede ser capaz de producir una enfermedad más grave, según la virulencia de los microorganismos que lo constituyen, según la productividad de la comunidad y la estructura del microbioma, y según la susceptibilidad del huésped que los alberga (Abusleme y col., 2013; Abusleme y col., 2021; Hajishengallis y col., 2020; Curtis y col., 2020), mostrando incluso una variación inesperada en las características inflamatorias (Abusleme y col., 2013). En cuanto a la diversidad alfa, a pesar de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas, la riqueza de especies fue mayor en Colombia en comparación con España, la diversidad alfa estuvo aumentada para los grupos de estadios I-II, tornándose baja en los grupos de estadios III-IV para ambos países (siendo levemente mayor en Colombia que en España), y en el grado C se observó mayor riqueza de especies y diversidad alfa, sobre todo en Colombia.

Estos hallazgos hacen replantearse la idea, de manera general, de si una mayor diversidad por sí sola puede usarse como un predictor de salud (Kumar, 2021). Posiblemente una dependencia excesiva de la diversidad como medida de la salud, podría ignorar las funciones de especie y cómo estas funciones dictan la naturaleza de las interacciones entre ellas (Kumar, 2021). Adicionalmente, las sutiles diferencias entre países, podrían explicarse según la hipótesis de que no siempre la sucesión ecológica primaria sucede con cambios o diferencias en las abundancias relativas del microbioma en todas las poblaciones, posiblemente por ciertas presiones ecológicas (Abusleme y col., 2013; Kumar, 2021). Esta se vería reforzada por los resultados dispares obtenidos en la diversidad de taxones en diferentes estudios en diferentes partes del mundo, donde en algunos se presenta de manera similar en salud y enfermedad (Galimanas y col., 2014; Zhuang y col., 2014), en otros se ve aumentada en la enfermedad (Abusleme y col., 2013; Galimanas y col., 2014; Li y col., 2014; Dabdoub y col., 2016; Tsai y col., 2018; Pérez-Chaparro y col., 2018; Wei y col.,

2019; Ikeda y col., 2020) y en algunos por el contrario se incrementa con la salud periodontal y/o gingivitis (Jorth y col., 2014; Park y col., 2015; Chen y col., 2018 b; Lenartova y col., 2021).

Una hipótesis que podría explicar específicamente el importante hallazgo sobre las aparentes diferencias en la riqueza de especies entre Colombia y España, sería la influencia de la pobreza, la capacidad y disponibilidad de servicios sociosanitarios, condiciones y costumbres, acceso a elementos de higiene, consumo de alimentos (ENSAB IV, 2014; Renson y col., 2019) o incluso por antecedentes genéticos en estos pacientes (Loos y col., 2005; Renson y col., 2019). En específico en lo referente a la alimentación, los españoles, a pesar de que han occidentalizado en alguna medida su dieta, basan su ingesta de alimentos en la dieta mediterránea, la cual consiste en un elevado aporte de nutrientes con importantes efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Trichopoulou y col., 2014; Gómez Sánchez y col., 2020), a diferencia de Colombia, donde según el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF), anualmente cada colombiano basa su dieta en comer 65 kilos de papa, 42,9 de arroz y 17 de carne (TCAC, 2018). Estos hábitos alimenticios poco saludables en los colombianos, sugeriría el fomento de un hábitat apto para una ecología patógena enriquecida, que podría ir en detrimento de los tejidos periodontales (Wright y col., 2020). Para ambas poblaciones la Abundancia Relativa estuvo marcada por la presencia preponderante de *Fusobacterium* (*Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, *Fusobacterium* sp. HMT 203), *Filifactor alocis*, Taxones sin asignación, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041 para todos los grupos de periodontitis, y *Streptococcus mitis* para salud/gingivitis.

La elevada abundancia relativa de *Fusobacterium* en ambas poblaciones sugiere una mayor prevalencia de la primera especie puente gram-negativa que se estableció en biopelículas de placa (Abusleme y col., 2021). También es claro que el microbioma patógeno de ambos países coexiste con una abundancia relativa significativa de patobiontes conocidos típicos de periodontitis (especies de *Fusobacterium*), junto con nuevos microorganismos que acompañan al desequilibrio en la ecología periodontal (*Filifactor alocis*) (Abusleme y col., 2021). Por lo tanto, esta disbiosis se caracterizaría por afectación de patobiontes

"establecidos" con la coexistencia de otros patobiontes con papel desconocido (*Filifactor alocis*), que en conjunto afectarían al desarrollo de la patología. Se podría incluso hipotetizar sobre la idea de que, según el presente estudio, se hacen visibles patobiontes no cultivables o difícilmente cultivables, que, según estudios previos, podrían tener mayor importancia en la incidencia clínica de la enfermedad, que los patobiontes conocidos (Pérez-Chaparro y col., 2014).

Cuando se compararon los grupos de salud/gingivitis con todos los estadios de la periodontitis en el presente estudio, en España se observaron mayores proporciones en los grupos de periodontitis de: *Porphyromonas endodontalis* (estadios I-II), *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy*, *Bacteroidales* [G-2] bacterium HMT 274, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5][*Eubacterium*] *saphenum*, *Mogibacterium timidum* (estadios III-IV) y *T. forsythia* (estadios I-II y III-IV), a diferencia de Colombia, donde las especies con mayores proporciones para los estadios de periodontitis fueron: *Filifactor alocis*, *Peptoniphilaceae* [G-1] bacterium HMT 113, *Selenomonas sputigen* (estadios I-II), *Fretibacterium* sp. HMT 361, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-6][*Eubacterium*] *nodatum* (estadios III-IV), Taxones sin asignación, *P. gingivalis*, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5][*Eubacterium*] *saphenum*, *Treponema denticola*, *Dialister invisus*, *Lachnospiraceae* [G-8] bacterium HMT 500, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*] *brachy* (estadios I-II y III-IV). Ambos países compartieron mayores proporciones de *Filifactor alocis* y de *Desulfobulbus* sp. HMT 041 en los grupos de periodontitis III-IV, en comparación con los grupos de salud/gingivitis. Los grupos de salud/gingivitis, a diferencia de los de periodontitis, estuvieron liderados por mayores proporciones en España de: Taxones sin asignación y de *Streptococcus intermedius*, en comparación con las mayores proporciones en Colombia para estos grupos de: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Granulicatella adiacens*, *Rothia dentocariosa*, *Leptotrichia hongkongensis*, *Bergeyella* sp. y *Rothia aeria*. Ambas poblaciones solo compartieron altas proporciones de *Corynebacterium matruchotii* y *Haemophilus parainfluenzae*, en los grupos de salud/gingivitis. Entre los grupos de estadios de la

periodontitis, los resultados mostraron mayores proporciones de especies para los estadios más severos en los pacientes Españoles de *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy*, *Desulfobulbus* sp. HMT 041, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369, y para los estadios menos severos para los pacientes Colombianos de *Leptotrichia* sp. HMT 417 y *Campylobacter gracilis*.

Es así que, según estos hallazgos y de manera general, los patobiontes más preponderantes en el microbioma de ambos países fueron no cultivables y difícilmente cultivables, entre los que principalmente estuvieron *Filifactor alocis*, Taxones sin asignación, *Peptostreptococcaceae* [XI][G-9][*Eubacterium*]*_brachy*, *Desulfobulbus* sp. HMT 041 y *Peptostreptococcaceae* [XI][G-5][*Eubacterium*]*_saphenum*, los cuales además fueron capaces de discriminar entre los estados periodontales para ambos países, superando ampliamente las proporciones de patógenos clave en el desarrollo de la periodontitis.

Estos resultados son consistentes con estudios mundiales llevados a cabo con secuenciación y con un diseño similar al presente estudio, donde se reportó que el microbioma subgingival marcado por taxones nuevos, difería entre sujetos sin periodontitis y con periodontitis (Kumar y col., 2005; Griffen y col., 2012; Abusleme y col., 2013; Wang y col., 2013; Ge y col., 2013; Galimanas y col., 2014; Li y col., 2014; Lourenço y col., 2014; Zhuang y col., 2014; Duran-Pinedo y col., 2014; Szafranski y col., 2015; Park y col., 2015; Kirst y col., 2015; Dabdoub y col., 2016; Tsai y col., 2018; Pérez-Chaparro y col., 2018; Chen y col., 2018 a; Shi y col., 2018; Chen y col., 2018 b; Wei y col., 2019; Cui y col., 2019; Schulz y col., 2019; López y col., 2020; Ikeda y col., 2020; Lenartova y col., 2021; Izawa y col., 2021) y con otros en los que se manifestó que el descubrimiento de nuevos patobiontes como *Filifactor alocis* y *Desulfobulbus* sp. HMT 041, asociados a progresiones severas de periodontitis, reafirmaron su relación con el biofilm de pacientes periodontalmente enfermos, por encima de los patógenos clave conocidos (Abu Fanas y col., 2021). En la Tabla 14 se describen los hallazgos de los estudios mencionados y en las Figuras 18 y 19, se observa el microbioma común y específico para las poblaciones en salud y en enfermedad, según los estudios revisados.

Tabla 14. Estudios donde se ha reportado el microbioma periodontal en sujetos sin periodontitis y con periodontitis, utilizando métodos de secuenciación.

Autor	Año	País	Muestra	Microbioma Sin Periodontitis	Microbioma Con Periodontitis
Kumar y col.	2005	Estados Unidos	15 sanos. 15 con periodontitis.	<i>Streptococcus</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Gemella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Campylobacter</i> y <i>Capnocytophaga</i> .	<i>Peptostreptococcus</i> , <i>Filifactor</i> , <i>Desulfobulbus</i> y <i>Megasphaera</i> (superaron en número a <i>P. gingivalis</i> y a otros patógenos clave).
Griffen y col.	2012	Estados Unidos	29 sanos. 29 con periodontitis.	<i>Proteobacterias</i> .	<i>Spiroquetas</i> , <i>Synergistetes</i> y <i>Bacteroidetes</i> . <i>Clostridia</i> , <i>Negativicutes</i> y <i>Erysipelotrichia</i> . <i>Filifactor</i> se encuentra en gran proporción, incluso más que <i>P. gingivalis</i> .
Liu y col.	2012	Estados Unidos	3 sanos. 2 con periodontitis.	<i>Streptococcus</i> , <i>Actinomyces</i> y <i>Granulicatella</i> .	<i>Selenomonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Treponema</i> , <i>Tannerella</i> , <i>Haemophilus</i> y <i>Catonella</i> .
Ge y col.	2013	Estados Unidos	88 sanos. 88 con periodontitis.	<i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Veillonella dispar</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> y <i>Actinomyces</i> sp.	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Treponema</i> , <i>Fusobacterium</i> y <i>Phocaeicola</i> .
Duran-Pinedo y col.	2014	Estados Unidos	12 sanos. 7 con periodontitis.	<i>Corynebacterium matruchotii</i> .	<i>P. gingivalis</i> , <i>T.forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> .
Galimanas y col.	2014	Canadá	11 sanos. 13 con periodontitis.	<i>Corynebacterium matruchotii</i> .	<i>T. forsythia</i> , <i>Filifactor alocis</i> y <i>Porphyromonas endodontalis</i> .
Kirst y col.	2015	Estados Unidos	25 sin periodontitis. 25 con periodontitis.	<i>Proteobacterias</i> .	<i>Filifactor alocis</i> y <i>Fretibacterium</i> sp.
Dabdoub y col.	2016	Estados Unidos	25 sanos. 25 con periodontitis.	<i>Actinomyces gerencseriae</i> , <i>A. oris</i> , <i>A. johnsonii</i> , <i>Selenomonas noxia</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Veillonella parvula</i> .	<i>Filifactor alocis</i> , <i>Methanobrevibacter oralis</i> , <i>M. smithii</i> , <i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> y <i>Methanosphaera stadmaniae</i> .
Chen y col. (a)	2018	Estados Unidos	21 sanos. 48 con periodontitis.	<i>Capnocytophaga</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Paludibacter</i> , <i>Opitutus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Actino bacteria</i> y <i>Leptotrichia</i> .	<i>Filifactor</i> , <i>Treponema</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Tannerella</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Desulfobulbus</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Magibacterium</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Hallella</i> , <i>Phocaeicola</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Johnsonella</i> y <i>Mycoplasma</i> .

AMÉRICA DEL NORTE

	Autor	Año	País	Muestra	Microbioma Sin Periodontitis	Microbioma Con Periodontitis
LATINOAMÉRICA	Abusleme y col.	2013	Chile	10 sanos. 22 con periodontitis.	<i>Rothia</i> , <i>Actinobacterias</i> y <i>Actinomyces</i> .	<i>Eubacterium</i> (G-5), Peptostreptococcaceae (G-1), Bacteroidetes (G-6), Bacteroidetes (G-5) y <i>Sneathia</i> .
	Lourenço y col.	2014	Brasil	38 sin periodontitis. 59 con periodontitis.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Gemella</i> spp., <i>Granulicatella</i> spp., <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Neisseria polysaccharea</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rothia dentocariosa</i> y <i>Streptococcus</i> spp.	<i>Treponema denticola</i> , <i>Actinobaculum</i> sp., <i>Alloprevotella tannerae</i> , <i>Anaeroglobus geminatus</i> , <i>Bacteroidales</i> spp., <i>Catonella morbi</i> , <i>Desulfobulbus</i> sp., <i>Dialister</i> spp., <i>Filifactor alocis</i> , <i>Fretibacterium</i> spp., <i>Peptostreptococcus stomatis</i> , <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> , <i>Solobacterium moorei</i> y TM7 spp.
	Pérez-Chaparro y col.	2018	Brasil	7 sanos. 9 con periodontitis.	<i>Streptococcus</i> sin clasificar, <i>Corynebacterium matruchotii</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Corynebacterium durum</i> , <i>Cardiobacterium</i> sin clasificar y <i>Bergeyella</i> .	<i>Fretibacterium</i> , <i>Eubacterium</i> [XI] [G-6], <i>Desulfobulbus</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> [XI] [G-1], [G-3], <i>Bacteroidetes</i> [G-3], <i>Bacteroidaceae</i> [G-1], <i>Filifactor alocis</i> , <i>Fretibacterium fastidiosum</i> , <i>Johnsonella</i> sp HOT166, <i>Peptostreptococcaceae</i> [XIII] [G-1] HOT113, <i>Porphyromonas endodontalis</i> y <i>Treponema</i> sp. HOT258
EUROPA	Szafranski y col.	2015	Alemania	10 sanos. 9 con periodontitis.	<i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Fusobacterium</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp.	<i>Peptostreptococcaceae</i> XIII [G-4] sp., <i>Eubacterium</i> XI [G-6] sp., <i>Peptostreptococcaceae</i> XI [G-4] sp. HOT 369, <i>Peptostreptococcus</i> HOT 113, <i>Desulfobulbus</i> sp. HOT 41 y <i>Eubacterium nodatum</i> HOT 694 y <i>Fretibacterium</i> spp.
	Schulz y col.	2019	Alemania	13 sin periodontitis. 13 con periodontitis.	<i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> y <i>Actinobacteria</i> .	<i>Filifactor alocis</i> .
	López y col.	2020	España	10 sanos. 12 con periodontitis.	<i>Actinobacteria</i> , <i>Actinomyces</i> y <i>Rothia</i> .	<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Tannerella</i> y <i>Treponema</i> .

	Autor	Año	País	Muestra	Microbioma Sin Periodontitis	Microbioma Con Periodontitis
	Lenartova y col.	2021	República Checa	108 sanos. 45 con periodontitis.	CT2 <i>Streptococcus mitis S. oralis</i> , CT43 <i>Streptococcus gordonii S. sanguinis</i> , CT6 <i>Veillonella dispar V. parvula</i> , CT25 <i>Neisseria flava N. mucosa</i> , CT27 <i>Neisseria subflava</i> , HMT14 <i>Neisseria oralis</i> , HMT718 <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , CT23 <i>Haemophilus haemolyticus</i> , CT24 <i>Haemophilus sputorum</i> , CT10 <i>Prevotella histicola</i> , CT37 <i>Gemella morbillorum</i> , CT48 <i>Rothia</i> , CT3 <i>Fusobacterium nucleatum</i> , CT8 <i>Porphyromonas pasteri P. catoniae</i> , HMT775 <i>Capnocytophaga sputigena</i> , HMT329 <i>Capnocytophaga leadbetteri</i> y CT51 <i>Capnocytophaga granulosa</i> , HMT311 <i>Prevotella oris</i> , CT53 <i>Tannerella sp.</i> y <i>Campylobacter gracilis</i> HMT623.	<i>Fretibacteria</i> CT12 y HMT 363, y <i>Filifactor alocis</i> HMT 539.
ASIA	Wang y col.	2013	China	6 salud. 5 con periodontitis.	<i>Actinobacterias, Proteobacteria.</i>	<i>Prevotella, Porphyromonas y Treponema.</i>
	Li y col.	2014	China	12 sanos. 25 con periodontitis.	<i>Proteobacteria.</i>	<i>Fusobacterium, Porphyromonas, Treponema, Filifactor, Eubacterium mTannerella, Hallella, Parvimona s, Peptostreptococcus y Catonella.</i>
	Zhuang y col.	2014	Sri Lanka	32 sin periodontitis. 32 con periodontitis.	<i>Fusobacteria, Espiroquetas. Brevibacterium, Granulicatella, Kluyvera, Leptotrichia, Neisseria, Shuttleworthia, Treponema y Veillonella.</i>	<i>Actinobacterias, Enterobacter, Eubacterium, Filifactor, Parvimonas Serratia y Staphylococcus.</i>
	Park y col.	2015	Corea	22 sin periodontitis. 10 con periodontitis.	<i>Proteobacteria, Streptococcus, Capnocytophaga, Leptotrichia y Haemophilus. Streptococcus pseudopneumoniae- Haemophilus parainfluenzae y Leptotrichia hongkongensis.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum y Fretibacterium fastidiosum.</i>
	Tsai y col.	2018	Taiwán	10 sanos. 10 con periodontitis.	<i>Lautropia, Parvimonas, Actinomyces, Capnocytophaga, Paludibacter, Streptococcus, Haemophilus y Corynebacterium.</i>	<i>Prevotella, Aggregatibacter, Porphyromonas, Treponema, Tannerella, Peptostreptococcus.</i>
	Chen y col. (b)	2018	China	20 sanos. 50 con periodontitis.	<i>Streptococcus, Haemophilus, Capnocytophaga, Gemella, Campylobacter y Granulicatella.</i>	<i>Porphyromonas, Treponema, Tannerella, Filifactor y Aggregatibacter.</i>
	Shi y col.	2018	China	3 sanos. 6 con periodontitis.	<i>Rothia y Corynebacterium.</i>	<i>Peptostreptococcus, Filifactor, Eubacterium_nodatatum_group, Butyrivibrio_2, Klebsiella, Bulleidia, Lactococcus, Wolinella y Acholeplasma.</i>

Autor	Año	País	Muestra	Microbioma Sin Periodontitis	Microbioma Con Periodontitis
Wei y col.	2019	China	9 sanos. 23 con periodontitis.	Los taxones evaluados estuvieron significativamente aumentados en periodontitis en comparación con salud.	<i>Veillonella</i> , <i>Treponema</i> , <i>Filifactor</i> , <i>Fretibacterium</i> , <i>Peptostreptococcaceae_ [XI] [G-6]</i> , <i>Peptostreptococcaceae_ [XI] [G-5]</i> , <i>Bacteroidetes_ [G-5]</i> , <i>Bacteroidetes_ [G-3]</i> , <i>Peptostreptococcaceae_ [XI] [G-4]</i> , <i>Peptostreptococcaceae_ [XI] [G-2]</i> .
Cui y col.	2019	China	15 sanos. 15 con periodontitis.	<i>Streptococcus spp.</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<i>Filifactor alocis</i> , <i>Desulfobulbus sp.</i> , <i>Fretibacterium sp.</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>Peptostreptococcaceae spp.</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Eubacterium nodatum</i> y <i>Eubacterium saphenum</i> .
Ikeda y col.	2020	Japón	10 sanos. 10 con periodontitis.	<i>Leptotrichia sp.</i> , <i>Neisseria subflava</i> , <i>Lautropia mirabilis</i> y <i>Rothia dentocariosa</i> .	<i>P. gingivalis</i> , <i>F. alocis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>Porphyromonas. endodontalis</i> , <i>Prevotella. denticola</i> , y <i>Prevotella tanneriae</i>
Izawa y col.	2021	Japón	6 sanos. 27 con periodontitis.	<i>Corynebacterium</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Rothia</i> y <i>Neisseria</i> .	<i>Dialister</i> , <i>Filifactor</i> , <i>Fretibacterium</i> y <i>Parvimonas</i> .

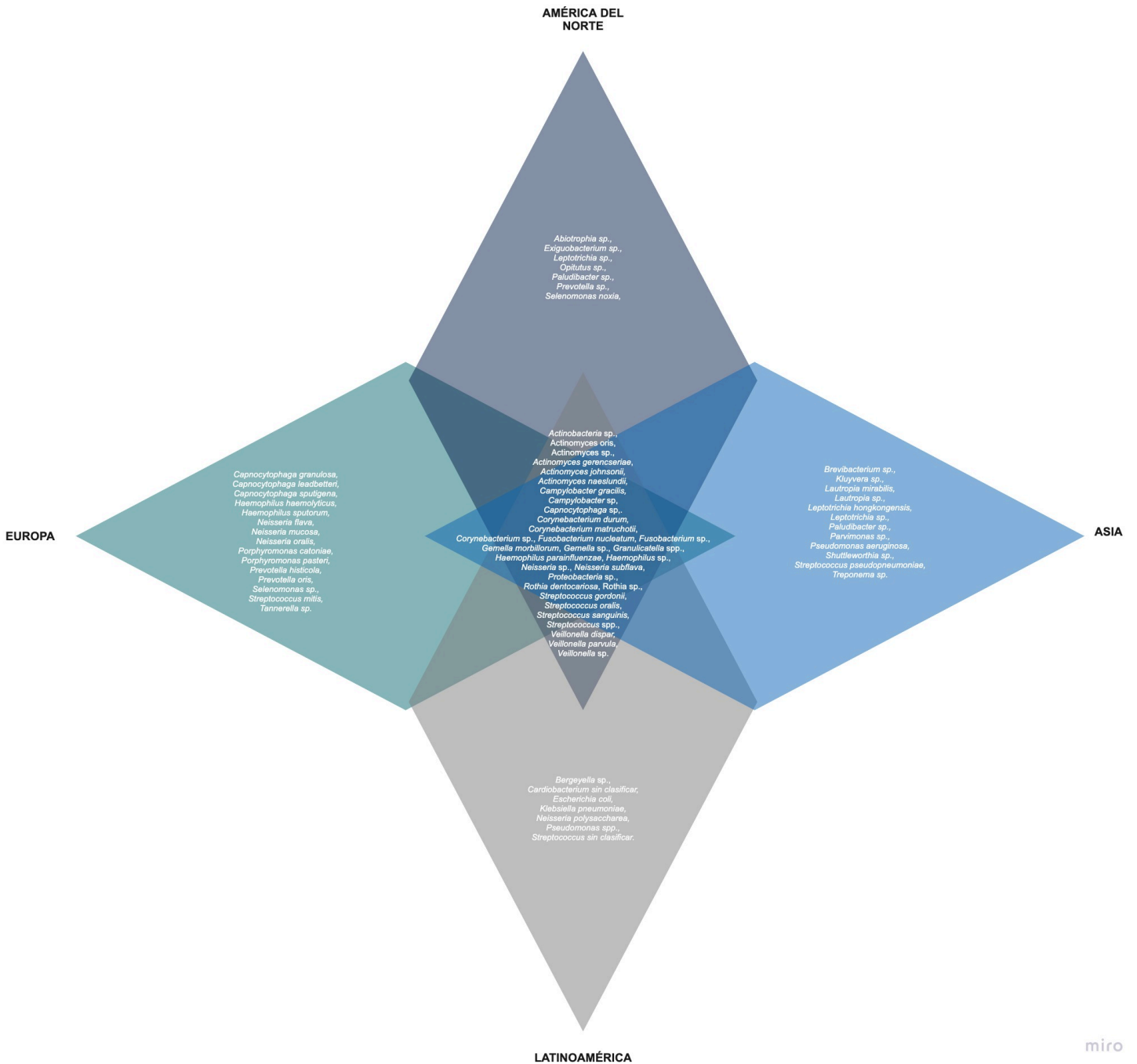


Figura 19. Descripción general de las especies bacterianas que definen a los sujetos con periodontitis.

Microbioma en periodontitis: las especies que se encuentran en la estrella donde confluyen todos los rombos, corresponden al microbioma común entre países para periodontitis. Los taxones bacterianos ubicados en cada rombo, corresponden al microbioma específico de cada población.

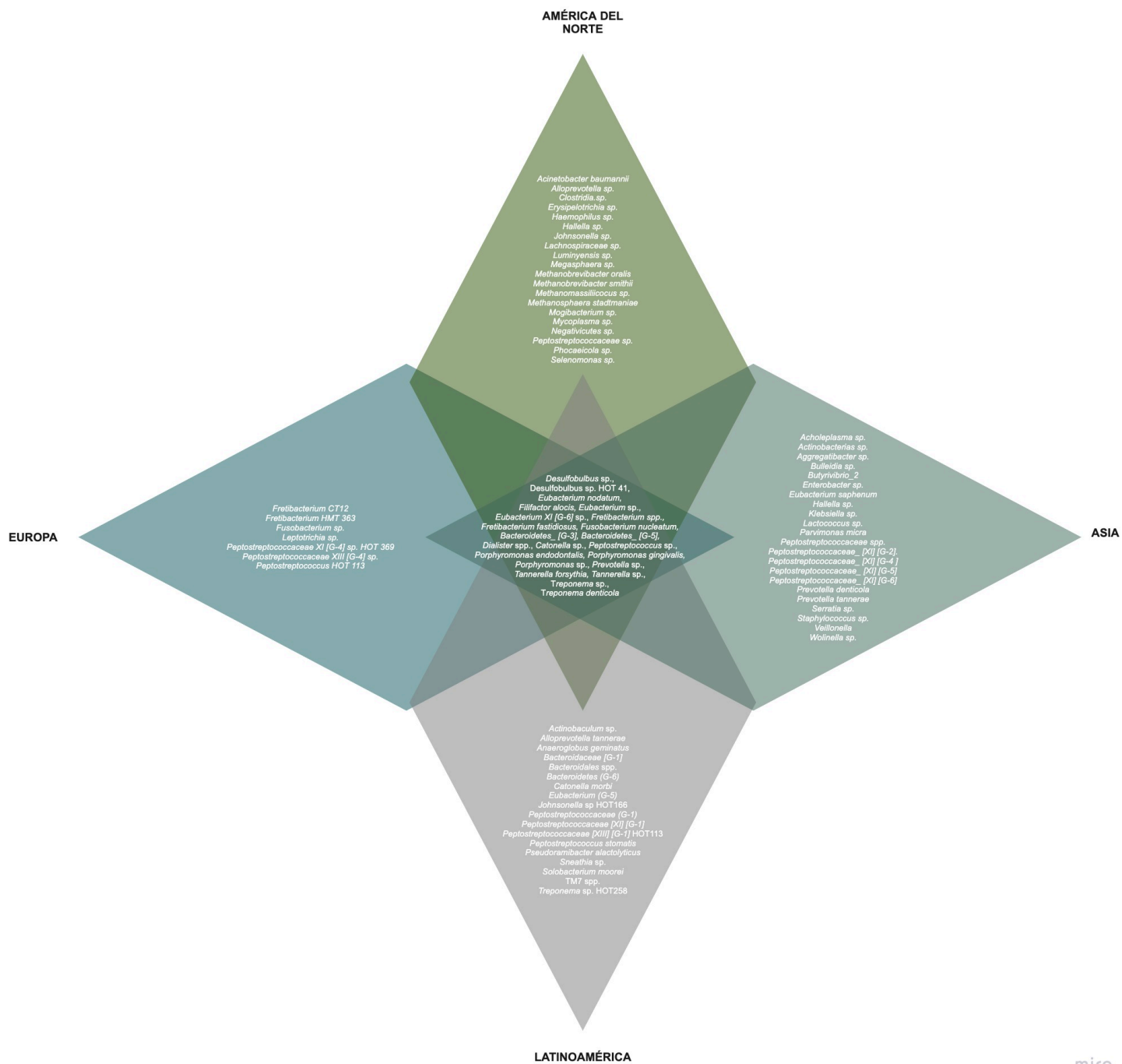


Figura 20. Descripción general de las especies bacterianas que definen a los sujetos sin periodontitis.

Microbioma sin periodontitis: las especies que se encuentran en la estrella donde confluyen todos los rombos, corresponden al microbioma común entre países sin periodontitis. Los taxones bacterianos ubicados en cada rombo, corresponden al microbioma específico de cada población.

Otro hallazgo interesante fue la presencia de Taxones sin asignación, lo que despierta el interés en conocer el papel de estos nuevos actores del microbioma subgingival, en el proceso de salud – enfermedad de las poblaciones estudiadas. Este resultado viene a reforzar el objetivo de estudiar los nuevos microorganismos aún no conocidos en el microbioma subgingival de los países, utilizando el nuevo sistema de clasificación periodontal (Papapanou y col., 2018).

El grado C evidenció una mayores proporciones de patobiontes (sobre todo no cultivables o difícilmente cultivables), específicamente en Colombia de *Filifactor alocis* y en España de *Desulfobulbus* sp. HMT 041 y de *Peptostreptococcaceae [XI][G-9][Eubacterium]_brachy*. Las diferencias detectadas, podrían estar relacionadas con la influencia de la geografía de las poblaciones en la ecología bacteriana (Abusleme y col., 2021).

Gracias a la secuenciación del gen ARNr 16S, se han demostrado diferencias aparentes en la composición de las comunidades bacterianas entre los pacientes de ambas poblaciones de estudio, con y sin periodontitis. Estos resultados no solo han confirmado algunos de los publicados anteriormente utilizando este tipo de técnicas moleculares (Kumar y col., 2005; Griffen y col., 2012; Abusleme y col., 2013; Wang y col., 2013; Ge y col., 2013; Galimanas y col., 2014; Li y col., 2014; Lourenço y col., 2014; Zhuang y col., 2014; Duran-Pinedo y col., 2014; Szafranski y col., 2015; Park y col., 2015; Kirst y col., 2015; Dabdoub y col., 2016; Tsai y col., 2018; Pérez-Chaparro y col., 2018; Chen y col., 2018 a; Shi y col., 2018; Chen y col., 2018 b; Wei y col., 2019; Cui y col., 2019; Schulz y col., 2019; López y col., 2020; Ikeda y col., 2020; Lenartova y col., 2021; Izawa y col., 2021) sino que también han revelado nuevos hallazgos de interés en la etiología polimicrobiana de la periodontitis, principalmente si se utilizan nuevos parámetros diagnósticos y sistemas de agrupamiento confiable entre secuencias (Caruso y col., 2019).

La clasificación de la periodontitis de 2018 no incluye diferentes tipos de periodontitis, sino una única entidad multidimensional (Papapanou y col., 2018), que podría estar asociada a diferentes perfiles microbianos. De esta forma, las estrategias clínicas deben modificarse para que se dirijan de forma individual y específica, para cada presentación de la enfermedad (medicina personalizada).

DISCUSIÓN GENERAL:

Ambos estudios llevados a cabo en la presente tesis, mostraron diferencias en el microbioma subgingival entre ambos países y para todos los estados periodontales (el Estudio #1 con resultados finales, y el Estudio #2 con resultados parciales). Las poblaciones estudiadas han sido comparables, debido a que fueron similares en términos de variables sociodemográficas y clínicas. Los dos estudios concordaron en que se evidenciaron diferencias en las comunidades bacterianas entre salud/gingivitis y periodontitis. En cuanto a la variabilidad, riqueza y diversidad de especies (en ambos estudios) la comunidad bacteriana en los pacientes colombianos fue más variable (Estudio #1), rica y diversa (Estudio #2), que la de los pacientes españoles, con predominio de especies nuevas (Estudio #2). Estas especies nuevas (no cultivables o difícilmente cultivables), parecieron dominar el microbioma en periodontitis (Pérez-Chaparro y col., 2014), por encima de los patógenos clave cultivables o conocidos. Además estos patobiontes no cultivables o difícilmente cultivables, a diferencia de los cultivables, podrían ser capaces de discriminar entre los estadios de periodontitis en los países motivo de estudio, con mayores proporciones de especies para los estadios más severos en España y para los estadios menos severos en Colombia. En adición, el hallazgo de Taxones sin asignación, abre la posibilidad de investigar actores aún no identificados característicos del proceso de salud-enfermedad en los pacientes, presentes en la periodontitis de los colombianos y en la salud/gingivitis de los españoles (Estudio #2). Estos resultados podrían sugerir que las características de las poblaciones en estudio posiblemente jugaron un papel importante en los resultados microbiológicos obtenidos, debido a la influencia de la pobreza, la capacidad y disponibilidad de servicios sociosanitarios, condiciones y costumbres, acceso a elementos de higiene, consumo de alimentos, a la genética de los individuos, entre otros (Contreras y col., 2015; Loos y col., 2005; ENSAB IV, 2014; Renson y col, 2019).

Además, queda de manifiesto que el uso de técnicas tradicionales como el cultivo bacteriano en conjunto con métodos de secuenciación del gen ARNr 16S (Vianna y col., 2005; Donachie y col., 2007; Teles y col., 2013), empleando el diagnóstico periodontal individualizado propuesto por el nuevo sistema de clasificación de las condiciones y

enfermedades periodontales y periimplantarias 2018, permitieron caracterizar el microbioma subgingival de dos poblaciones distintas del mundo.

POSIBLES LIMITACIONES:

Entre las limitaciones de ambos estudios desarrollados en la presente tesis, podrían estar:

1. La imposibilidad de un emparejamiento absoluto de las muestras (quizás por eso las discrepancias en los resultados de las características clínicas).
2. El análisis microbiológico de las muestras de estudio se realizó en paralelo en dos laboratorios independientes, aunque fueron entrenados y calibrados en cultivo bacteriano.
3. El tamaño de muestra relativamente pequeño.
4. Las diferencias en las características demográficas (p. ej., tabaquismo) y clínicas (niveles de placa o sangrado) de la población estudiada. Además, no se registró información sobre el nivel socioeconómico y los pacientes fueron reclutados exclusivamente en clínicas universitarias.
5. Las diferencias en las características geográficas y biológicas propias de las poblaciones estudiadas.

IMPLICACIONES PRÁCTICAS:

La medicina personalizada se basa en el paradigma de que los factores que afectan la susceptibilidad a la enfermedad, son únicos para cada individuo y están significativamente influenciados por factores como el genotipo del huésped, en el que, características como la raza/etnia (entre otras), son determinantes importantes (Mason y col., 2013).

Se sugiere que esto sucedería para las infecciones microbianas agudas y crónicas como las enfermedades periodontales, donde las comunidades microbianas orales difieren entre las etnias, siendo al parecer la base de las susceptibilidades diferenciales a las enfermedades (Mason y col., 2013).

Por tanto, se justifica la realización de estudios longitudinales para probar estas hipótesis y comprender mejor la posible relevancia clínica y el posible impacto del uso del diagnóstico microbiológico, debido a que la clasificación de periodontitis de 2018 que incluye una única entidad multidimensional (Tonetti y col., 2018), podría estar asociada con diferentes perfiles microbianos al comparar poblaciones.

De esta manera se podrían seleccionar tratamientos y estrategias terapéuticas específicas para cada perfil, en el contexto de la medicina personalizada.

9. CONCLUSIÓN

A magnifying glass icon with a dark grey handle and a dark blue outline, positioned over the word 'CONCLUSIÓN' in the title. The magnifying glass is tilted slightly to the right, and its lens is centered over the word, making it appear larger and more prominent.

CONCLUSIÓN GENERAL:

Considerando las limitaciones de estos estudios, se puede concluir que hay diferencias en el microbioma subgingival de dos poblaciones distintas, en Colombia y España, diagnosticadas según la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias de 2018, así como entre las diferentes condiciones periodontales comparadas.

CONCLUSIONES ESPECÍFICAS:

Estudio #1:

En el análisis mediante cultivo microbiológico, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la microbiota subgingival entre salud periodontal/gingivitis y periodontitis, con diferencias menores entre estadios de periodontitis. Las diferencias también fueron relevantes entre países, con Colombia mostrando mayores recuentos y variabilidad de especies bacterianas.

Estudio #2:

En el análisis mediante secuenciación del gen ARNr 16S, las especies no cultivables o difícilmente cultivables (entre ellas, los Taxones sin asignación), mostraron diferencias entre los estadios y grados de periodontitis y entre las poblaciones estudiadas.

10. REFERENCIAS



- AAP. 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1, 926-32.
- Abu Fanas, S., Brigi, C., Varma, SR., Desai, V., Senok, A., D'souza, J. 2021. The prevalence of novel periodontal pathogens and bacterial complexes in Stage II generalized periodontitis based on 16S rRNA next generation sequencing. *J Appl Oral Sci*, 17(29), e20200787.
- Abusleme, L., Dupuy, A.K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J.A., Strausbaugh, L.D., Gamonal, J., Diaz, P.I. 2013. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 7(5),1016.
- Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B.Y., Diaz, P.I. 2021. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000*, 86, 57-78.
- Albandar, J.M. 2005. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin N Am*, 49, 517-532.
- Ali, R.W., Bakken, V., Nilsen, R., Skaug, N. 1994. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *J Periodontol*, 65(11), 1046-52.
- Alsina, M., Olle, E., Frias, J. 2001. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*, 39, 509-513.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59, 143-169.
- Armitage, G.C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1–6.
- Aruni, A.W., Mishra, A., Dou, Y., Chioma, O., Hamilton, B.N., Fletcher, H.M. 2015. Filifactor alocis — a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect*, 17(7), 517-30.
- Aruni, A.W., Roy, F., Fletcher, H.M. 2011. Filifactor alocis Has Virulence Attributes That Can Enhance Its Persistence under Oxidative Stress Conditions and Mediate Invasion of Epithelial Cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 79(10), 3872-86.
- Badersten, A., Nilveus, R., Egelberg, J. 1985. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. *J Clin*

Periodontol, 12 (6), 432-440.

Barraclough, T.G. 2015. How do species interactions affect evolutionary dynamics across whole communities? *Ann Rev Ecol Evol Systemat*, 46, 25-48.

Bartold, P.M., Van Dyke, T.E. 2019. An appraisal of the role of specific bacteria in the initial pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 46, 6-11.

Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., Abebe, E. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(142), 1935-43.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., ... Caporaso, J. G. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*, 37(8), 852-857.

Bonfim, M de L., Mattos, F.F, Ferreira e Ferreira, E., Campos, A.C, Vargas, A.M. 2013. Social determinants of health and periodontal disease in Brazilian adults: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 13,22.

Bordenstein, S. R., Theis, K. R. 2015. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol*, 13, e1002226.

Botero, J.E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourt, M., Arce, R.M. 2007. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol*, 78, 696-704.

Bravo Pérez, M., Almerich Silla, J.M., Canorea Díaz, E., Casals Peidró, E., Cortés Martincorena F.J., Expósito Delgado, A.J., Gómez Santos, G., Hidalgo Olivares, G., Lamas Oliveira, M., Martínez Beneyto, Y., Monge Tàpies, M., Montiel Company, J.M., Navarro Moreno, M.I., Otero Casal, M.P., Sainz Ruiz, C., Trullols Casas, M.C. 2020. Encuesta de salud oral en España 2020. *RCOE*, 25(4), 12-69.

Bravo Pérez, M., Almerich Silla, J.M., Ausina Márquez, V., et al. 2016. Encuesta de salud oral en España 2015. *RCOE*, 21(1), 8-48.

Bravo, M., Casals, E., Cortes, F. Llodra, J. 2006. Encuesta de Salud Oral en España 2005.

RCOE, 11, 409-456.

Caffesse, R.G. 2015. A Latin American perspective of periodontology. *Periodontol 2000*, 67, 7-12.

Callahan, B.J, Wong, J., Heiner, C., et al. 2019. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res*, 47(18), e103-e103.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W, Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. 2016. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 13 (7), 581-583.

Canigia, L.F, Moreira, A.N, Furman, C., Piovano, S., Bianchini, H. 1999. Microbiological assessment of subgingival plaques from Argentinian patients with adult periodontitis. *Anaerobe*, 5, 263-265.

Cao, C.F, Aeppli, D.M, Liljemark, W.F, Bloomquist, C.G, Bandt, C.L, Wolff, L.F. 1990. Comparison of plaque microflora between Chinese and Caucasian population groups. *J Clin Periodontol*, 17(2), 115-8.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 108(1), 4516-4522.

Carasol, M.,Llodra, J.C.,Fernandez-Meseguer, A.,Bravo, M., Garcia-Margallo, M.T., Calvo-Bonacho, E., Sanz, M., Herrera, D. 2016. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J Clin Periodontol*, 43, 548-556.

Caro-Quintero, A., Ochman, H. 2015. Assessing the unseen bacterial diversity in microbial communities. *Genome Biol Evol*, 7(12), 3416-3425.

Caruso, V., Song, X., Asquith, M., Karstens, L. 2019. Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. *mSystems*, 4(1), e00163-18.

Caton, J.G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I.L.C., Jepsen, S., Kornman, K.S., Mealey, B.L., Papapanou, P.N., Sanz, M., Tonetti, M.S. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions-Introduction and key changes

- from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*, 45(20), S1-S8.
- Chahboun, H., Arnau, M.M., Herrera, D., Sanz, M., Ennibi, O.K. 2015. Bacterial profile of aggressive periodontitis in Morocco: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 15, 25.
- Chapple, I.L. 2019. Periodontal Health and Gingivitis. Guidance for clinicians. *EFP*.
- Chapple, I.L., Genco, R. 2013. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Disease. *J Clin Periodontol*, 40(14), 106-112.
- Chapple, I., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., Shapira, L., ... Yoshie, H. 2018. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45(20), S68-S77.
- Chen, C., Hemme, C., Beleno, J., Shi, Z.J., Ning, D., Qin, Y., Tu, Q., Jorgensen, M., He, Z., Wu, L., Zhou, J. 2018 a. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J*, 12(5), 1210-1224.
- Chen, W.P., Chang, S.H., Tang, C.Y., Liou, M.L., Tsai, S.J., Lin, Y.L. 2018 b. Composition Analysis and Feature Selection of the Oral Microbiota Associated with Periodontal Disease. *Biomed Res Int*, 2018, 3130607.
- Citron, D.M. 2002. Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus fusobacterium. *Clin Infect Dis*, 35(1), S22-27.
- Collins, J.R., Chinea, S., Cuello, R.J., Florian, A.P., Palma, P., Ambrosio, N., Marín, M.J., Figuero, E., Herrera, D. 2019. Subgingival microbiological profile of periodontitis patients in Dominican Republic. *Acta Odontol Latinoam*, 32(1), 36-43.
- Colombo, A. P., Boches, S. K., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Dewhirst, F., Paster, B. J. 2009. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification

- microarray. *J Periodontol*, 80(9), 1421-32.
- Contreras, A., Moreno, S.M., Jaramillo, A., Pelaez, M., Duque, A., Botero, J.E., Slots, J. 2015. Periodontal microbiology in Latin America. *Periodontol 2000*, 67, 58-86.
- Cortelli, J.R., Cortelli, S.C., Jordan, S., Haraszthy, V.I., Zambon, J.J. 2005. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32, 860-866.
- Cortelli, S.C., Costa, F.O., Kawai, T., Aquino, D.R., Franco, G.C., Ohara, K., Roman-Torres, C.V., Cortelli, J.R. 2009. Diminished treatment response of periodontally diseased patients infected with the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*, 47, 2018-2025.
- Cox, M.J., Cookson, W.O., Moffatt, M.F. 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet*, 22(R1), R88-94.
- Cross, K. L., Chirania, P., Xiong, W., Beall, C. J., Elkins, J. G., Giannone, R. J., Griffen, A. L., Guss, A. M., Hettich, R. L., Joshi, S. S., Mokrzan, E. M., Martin, R. K., Zhulin, I. B., Leys, E. J., Podar, M. 2018. Insights into the Evolution of Host Association through the Isolation and Characterization of a Novel Human Periodontal Pathobiont, *Desulfobulbus oralis*. *MBio*, 9(2), e02061-17.
- Cui, X., Liu, J., Xiao, W., Chu, Y., Ouyang, X. 2019. Subgingival microbiome in Chinese patients with generalized aggressive periodontitis compared to healthy controls. *Arch Oral Biol*, 101, 92-99.
- Curtis, M.A., Díaz, P.I., Van Dyke, T.E. 2020. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 83, 14-25.
- Dabdoub, S.M., Ganesan, S.M., Kumar, P.S. 2016. Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis. *Sci Rep*, 6, 38993.
- Deng, Z.L., Szafranski, S.P., Jarek, M., Bhujju, S., Wagner-Döbler, I. 2017. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep*, 7(1), 3703.
- Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C., Yu, W.H., Lakshmanan, A., Wade,

- W.G. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192(19), 5002-17.
- Diakite, A., Dubourg, G., Dione, N., Afouda, P., Bellali, S., Ngom, I.I., Valles, C., Tall, M.L., Lagier, J.C., Raoult, D. 2020. Optimization and standardization of the culturomics technique for human microbiome exploration. *Sci Rep*, 10(1), 9674.
- Ding, T., Schloss, P.D. 2014. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 509(7500), 357-60.
- Donachie, S.P., Foster, J.S., Brown, M.V. 2007. Culture clash: Challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J*, 1, 97-99.
- Downes, J., Dewhirst, F.E., Tanner, A.C.R., Wade, W.G. 2013. Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneriae* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneriae* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(4), 1214-1218.
- 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 J*, 8(8), 1659-72.
- Duran-Pinedo, A.E., Paster, B., Teles, R., Frias-Lopez, J. 2011. Correlation network analysis applied to complex biofilm communities. *PLoS One*, 6(12), e28438.
- Dye B. A. 2012. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000*, 58(1), 10-25.
- Eisenmann, A.C., Eisenmann, R., Sousa, O., Slots, J. 1983. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. *J Periodontol*, 54, 712-713.
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., Taylor, G. W., Page, R. C., Beck, J. D. Genco, R. J. 2015. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*, 86, 611-622.
- Eke, P.I., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Borrell, L.N., Borgnakke, W.S., Dye, B., Genco, R.J. 2016. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*, 87, 1174-1185.
- Escapa, I.F., Chen, T., Huang, Y., Gajare, P., Dewhirst, F.E., Lemon, K.P. 2018. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive

- Tract. *mSystems*, 3(6), e00187-18.
- Fabris. A.S., DiRienzo, J.M., Wikström, M., Mayer, M.P. 2002. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol*, 17, 231-238.
- Fischer, R.G., Lira Junior, R., Retamal-Valdes, B., Figueiredo, L.C., Malheiros, Z., Stewart, B., Feres, M. 2020. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Braz Oral Res*, 34(11), e026.
- Frencken, J.E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D., Dietrich, T. 2017. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*, 44(18), S94-S105.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A., Gamonal, J. 2005. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol*, 76, 289-294.
- Galimanas, V., Hall, M.W., Singh, N., Lynch, M.D., Goldberg, M., Tenenbaum, H., Cvitkovitch, D.G., Neufeld, J.D., Senadheera, D.B. 2014. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. *Microbiome*, 2, 32.
- Ge, X., Rodriguez, R., Trinh, M., Gunsolley, J., Xu, P. 2013. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *PLoS One*, 8(6), e65520.
- Gjeramo, P., Rosing, C., Susin, C., Oppermann, R. 2002. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000*, 29, 70-78.
- Gomez, A., Espinoza, J.L., Harkins, D.M., Leong, P., Saffery, R., Bockmann, M., Torralba, M., Kuelbs, C., Kodukula, R., Inman, J., Hughes, T., Craig, J.M., Highlander, S.K., Jones, M.B., Dupont, C.L., Nelson, K.E. 2017. Host Genetic Control of the Oral Microbiome in Health and Disease. *Cell Host Microbe*, 22(3), 269-278.e3.
- Gómez Sánchez, M., Gómez Sánchez, L., Patino-Alonso, M. C., Alonso-Domínguez, R., Sánchez-Aguadero, N., Lugones-Sánchez, C., Rodríguez Sánchez, E., García Ortiz, L., Gómez-Marcos, M. A. 2020. Adherence to the Mediterranean Diet in Spanish

Population and Its Relationship with Early Vascular Aging according to Sex and Age: EVA Study. *Nutrients*, 12(4), 1025.

Griffen, A.L., Beall, C.J., Campbell, J.H., Firestone, N.D., Kumar, P.S., Yang, Z.K., Podar, M., Leys, E.J. 2012. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*, 6(6), 1176-85.

Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Human Microbiome Consortium, Petrosino, J. F., Knight, R., Birren, B. W. 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome res*, 21(3), 494-504.

Haffajee, A.D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N.J., Socransky, S.S. 2004. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol*, 31, 996-1002.

Haffajee, A.D., Teles, R.P., Socransky, S.S. 2006. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 21(5), 269-82.

Hajishengallis, G. 2014. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*, 29, 248-257.

Hajishengallis, G., Diaz, P.I. 2020. *Porphyromonas gingivalis*: Immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis. *Curr Oral Health Rep*, 7, 12-21.

Hajishengallis, G., Lamont, R.J. 2012. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 27, 409-419.

Hajishengallis, G., Lamont, R.J. 2016. Dancing with the stars: how choreographed bacterial interactions dictate nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. *Trends Microbiol*, 24, 477-489.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*, 4(1), 9.

Haubek, D., Ennibi, O.K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S., Kilian, M. 2008. Risk of

aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, 371, 237-242.

Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J.E., Leon, R. 2008. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J. Clin. Periodontol*, 35, 106-113.

Holt, C.A., Roth, A.E. 2004. The Nash equilibrium: a perspective. *Proceed Nat Acad Sci*, 101, 3999-4002.

Holt, S.C., Ebersole, J.L. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: The “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, 38, 72-122.

Holtfreter, B., Albandar, J.M., Dietrich, T., Dye, B.A., Eaton, K.A., Eke, P.I., Papapanou, P.N., Kocher, T., Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. 2015. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *J Clin Periodontol*, 42(5), 407-12.

Hong, B.Y., Furtado Araujo, M.V., Strausbaugh, L.D., Terzi, E., Ioannidou, E., Diaz, P.I. 2015. Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. *PLoS One*, 10(5), e0127077.

Human Oral Microbiome Database (HOMD). 2021. Available online at: <http://www.homd.org/> (Accessed on 15 November 2021).

Ikeda, E., Shiba, T., Ikeda, Y., Suda, W., Nakasato, A., Takeuchi, Y., Azuma, M., Hattori, M., Izumi, Y. 2020. Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis. *Odontology*, 108(2), 280-291.

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) Colombia. 2018. Tabla de Composición de Alimentos (TCAC) 2018. https://www.icbf.gov.co/system/files/tcac_web.pdf (Accessed on 20 November 2021).

Izawa, K., Okamoto-Shibayama, K., Kita, D., Tomita, S., Saito, A., Ishida, T., Ohue, M., Akiyama, Y., Ishihara, K. 2021. Taxonomic and Gene Category Analyses of Subgingival

- Plaques from a Group of Japanese Individuals with and without Periodontitis. *Int J Mol Sci*, 22(10), 5298.
- Johnson, I., Zaretskaya, Y., Raytselis, Y., Merezhuk, S., McGinnis, Madden, T.L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W5-9.
- 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), e01012-14.
- Jung, D., Machida, K., Nakao, Y., Kindaichi, T., Ohashi, A., Aoi, Y. 2021. Triggering Growth via Growth Initiation Factors in Nature: A Putative Mechanism for *in situ* Cultivation of Previously Uncultivated Microorganisms. *Front Microbiol*, 12, 537194.
- Kamada, N., Chen, GY., Inohara, N., Núñez, G. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*, 14, 685-690.
- Kassebaum, N.J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C.J., Marcenes, W. 2014. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*, 93(11), 1045-53.
- Kilian, M., Chapple, I., Hannig, M. et al. 2016. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*, 221, 657-666.
- Kinane, D.F., Stathopoulou, P.G., Papapanou, P.N. 2017. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17038.
- Kirst, M.E., Li, E.C., Alfant, B., Chi, Y.Y., Walker, C., Magnusson, I., Wang, G.P. 2015. Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Appl Environ Microbiol*, 81(2), 783-93.
- Kistler, J.O., Booth, V., Bradshaw, D.J., Wade, W.G. 2013. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS ONE*, 8(8), e71227.
- Kremer, B.H., Loos, B.G., van der Velden, U., van Winkelhoff, A.J., Craandijk, J., Bulthuis, H.M., Hutter, J., Varoufaki, A.S., van Steenberghe, T.J. 2000. Peptostreptococcus micros smooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *J Periodontol*, 71, 209-218.
- Kuboniwa, M., Houser, J. R., Hendrickson, E. L., Wang, Q., Alghamdi, S. A., Sakanaka, A.,

- Miller, D. P., Hutcherson, J. A., Wang, T., Beck, D., Whiteley, M., Amano, A., Wang, H., Marcotte, E. M., Hackett, M., Lamont, R. J. 2017. Metabolic crosstalk regulates *Porphyromonas gingivalis* colonization and virulence during oral polymicrobial infection. *Nat Microbiol*, 2(11), 1493-1499.
- Kumar, P.S. 2017. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol*, 595(2), 465-476.
- Kumar, P.S. 2020. Microbiomics: Were we all wrong before? *Periodontol 2000*, 85, 8-11.
- Kumar, P.S. 2021. Microbial dysbiosis: The root cause of periodontal disease. *J Periodontol*, 92, 1079-1087.
- Kumar, P.S., Dabdoub, S.M., Ganesan, S.M. 2020. Probing periodontal microbial dark matter using metataxonomics and metagenomics. *Periodontol 2000*. 2020 b., 85, 2-27.
- Kumar, P.S., Griffen, A.L., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. 2005. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol*, 43(8), 3944-55.
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., Hugenholtz, P. 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol*, 12(1), 118-23.
- Kutsal, D., Bilgin, Çetin, M., Durukan, E., Bulut, Ş. 2021. Evaluation of the effect of periodontitis on quality of life using Oral-Dental Health-Related Quality of Life-United Kingdom scale. *Int J Dent Hygiene*, 19, 305-312.
- Lafaurie, G. I., Contreras, A., Barón, A., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A., Giraldo, A., González, F., Mantilla, S., Botero, A., Archila, L. H., Díaz, A., Chacón, T., Castillo, D. M., Betancourt, M., Del Rosario Aya, M., Arce, R. 2007. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: A multicenter study. *J Periodontol*, 78, 629-639.
- Lagier, J.C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D. 2018. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*, 16, 540-550.
- Lamont, R.J., Koo, H., Hajishengallis, G. 2018. The oral microbiota: Dynamic communities

- and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 16, 745-759.
- Lang, N.P., Bartold, P.M. 2018. Periodontal health. *J Periodontol*, 89(1), S9-S16.
- Lanza, E., Magan-Fernandez, A., Bermejo, B., de Rojas, J., Marfil-Alvarez, R., Mesa, F. 2016. Complementary clinical effects of red complex bacteria on generalized periodontitis in a caucasian population. *Oral Dis*. 2016, 22(5), 430-7.
- Lenartova, M., Tesinska, B., Janatova, T., Hrebicek, O., Mysak, J., Janata, J., Najmanova, L. 2021. The Oral Microbiome in Periodontal Health. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 629723.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaiss, C.A., Elinav, E. 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 17, 219-232.
- Li, W., Godzik, A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22, 1658-1659.
- Li, Y., Feng, X., Xu, L., Zhang, L., Lu, R., Shi, D., Wang, X., Chen, F., Li, J., Meng, H. 2015. Oral microbiome in chinese patients with aggressive periodontitis and their family members. *J Clin Periodontol*, 42, 1015-1023.
- Li, Y., He, J., He, Z., Zhou, Y., Yuan, M., Xu, X., Sun, F., Liu, C., Li, J., Xie, W., Deng, Y., Qin, Y., VanNostrand, J.D., Xiao, L., Wu, L., Zhou, J., Shi, W., Zhou, X. 2014. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J*, 8(9), 1879-91.
- Liu, B., Faller, L.L., Klitgord, N., Mazumdar, V., Ghodsi, M., Sommer, D.D., Gibbons, T.R., Treangen, T.J., Chang, Y.C., Li, S., Stine, O.C., Hasturk, H., Kasif, S., Segrè, D., Pop, M., Amar, S. 2012. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One*, 7(6), e37919.
- Llodra, J. 2012. Encuesta de salud oral en España 2010. *RCOE*, 17, 13-41.
- Llodra, J., Bravo, M. Cortés, F. 2002. Encuesta de Salud Oral en España 2000. *RCOE*, 7, 1-57.
- Lloyd, K.G., Steen, A.D., Ladau, J., Yin, J., Crosby, L. 2018. Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. *mSystems*, 3(5), e00055-18.
- Loos, B.G., John, R.P., Laine, M.L. 2005. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*, 32(6), 159-179.

- 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. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 25(6), e745-e751.
- Lopez, N.J., Socransky, S.S., Da Silva, I., Japlit, M.R., Haffajee, A.D. 2004. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 75, 717-725.
- Lourenço, T.G., Heller, D., Silva-Boghossian, C.M., Cotton, S.L., Paster, B.J., Colombo, A.P. 2014. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol*, 41(11), 1027-36.
- Lynch, M.A., Ship, I.I. 1967. Initial oral manifestations of leukemia. *J Am Dent Assoc*, 75, 932-940.
- Marcenes, W., Kassebaum, N.J., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., Murray, C.J. 2013. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*, 92, 592-597.
- Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., Rieken, C.W., Dewhirst, F.E., Borisy, G.G. 2016. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(6), e791-e800.
- Martellacci, L., Quaranta, G., Patini, R., Isola, G., Gallenzi, P., Masucci, L. 2019. A Literature Review of Metagenomics and Culturomics of the Peri-implant Microbiome: Current Evidence and Future Perspectives. *Materials*, 12(18), 3010.
- Martinez-Pabon, M.C., Isaza-Guzman, D.M., Mira-Lopez, N.R., Garcia-Velez, C., Tobon-Arroyave, S.I. 2010. Screening for subgingival occurrence of gram-negative enteric rods in periodontally diseased and healthy subjects. *Arch Oral Biol*, 55, 728-736.
- Mason, M.R., Nagaraja, H.N., Camerlengo, T., Joshi, V., Kumar, P.S. 2013. Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome. *PLoS One*, 8(10), e77287.
- Mayorga-Fayad, I., Lafaurie, G.I., Contreras, A., Castillo, D.M., Baron, A., Aya, M. 2007. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogota, Colombia: An epidemiological approach. *Biomedica*, 27, 21-33.
- Meyle, J., Chapple, I. 2015. Molecular aspects of the pathogenesis of

- periodontitis. *Periodontol 2000*, 69, 7-17.
- Michalowicz, B. S., Aeppli, D. P., Kuba, R. K., Bereuter, J. E., Conry, J. P., Segal, N. L., Bouchard, T. J., Jr, Pihlstrom, B. L. 1990. A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *J Dent Res*, 70, 1431-1435.
- Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. 2014. IV Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV) 2014. Available online: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf>. (Accessed on 28 October 2021).
- Ministerio de Salud. 1998. III Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB III). *Centro Nacional de Consultoría*.
- Mira, A., Simon-Soro, A., Curtis, M.A. 2017. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol*, 44(18), S23-S38.
- Mizutani, S., Ekuni, D., Tomofuji, T., Azuma, T., Kataoka, K., Yamane, M., Iwasaki, Y., Morita, M. 2015. Relationship between xerostomia and gingival condition in young adults. *J Periodontol Res*, 50, 74-79.
- Moffatt, C.E., Whitmore, S.E., Griffen, A.L., Leys, E.J., Lamont, R.J. 2011. Filifactor alocis interactions with gingival epithelial cells. *Mol Oral Microbiol*, 26(6), 365-73.
- Montenegro, S.C.L., Retamal-Valdes, B., Bueno-Silva, B., Duarte, P.M., Faveri, M., Figueiredo, L.C., Feres, M. 2020. Do patients with aggressive and chronic periodontitis exhibit specific differences in the subgingival microbial composition? A systematic review. *J Periodontol*, 91(11), 1503-1520.
- Moore, W.E., Moore, L.V. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 66-77.
- Morozova, O., Marra, M.A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 92(5), 255-64.
- Murakami, S., Mealey, B.L., Mariotti, A., Chapple, I.L.C. 2018. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*, 89(1), S17-S27.
- Needleman, I., Garcia, R., Gkraniias, N., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Iorio, A. D., Moreno, F., Petrie, A. 2018. Mean annual attachment, bone level and tooth loss: A systematic

- review. *J Clin Periodontol*, 45(20), S112-S129.
- Ng, E., Tay, J., Balan, P., Ong, M., Bostanci, N., Belibasakis, G. N., Seneviratne, C. J. 2021. Metagenomic sequencing provides new insights into the subgingival bacteriome and aetiopathology of periodontitis. *J Periodont Res*, 56, 205-218.
- O'Leary, T.J., Drake, R.B., Naylor, J.E. 1972. The plaque control record. *J Periodontol*, 43, 38.
- Pacheco-Montealegre, M.E., Dávila-Mora, L.L., Botero-Rute, L.M., Reyes, A., Caro-Quintero, A. 2020. Fine Resolution Analysis of Microbial Communities Provides Insights into the Variability of Cocoa Bean Fermentation. *Front. Microbiol*, 11, 1-15.
- Page, R. C., Kornman, K. S. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14, 9-11.
- Palmer, R. J., Jr, Shah, N., Valm, A., Paster, B., Dewhirst, F., Inui, T., Cisar, J. O. 2017. Interbacterial adhesion networks within early oral biofilms of single human hosts. *Appl Environ Microbiol*, 83(11), e00407-17.
- Papapanou, P. N. 2012. The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. *J Dent Res*, 91, 907-908.
- Papapanou, P.N. 1998. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*, 1, 1-36.
- Papapanou, P.N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D.H., Flemmig, T.F., Garcia, R., Giannobile, W.V., Graziani, F., et al. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45(20), S162-S170.
- Papapanou, P.N., Susin, C. 2017. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontol 2000*, 75, 45–51.
- Park, O.J., Yi, H., Jeon, J.H., Kang, S.S., Koo, K.T., Kum, K.Y., Chun, J., Yun, C.H., Han, S.H. 2015. Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J Dent Res*, 94(7), 921-7.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G. 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123-4.
- Peacock, K.A. 2011. The three faces of ecological fitness. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, 42, 99-105.

- Pérez-Chaparro, P.J., Gonçalves, C., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P., Feres, M. 2014. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res*, 93(9), 846-58.
- Pérez-Chaparro, P.J., McCulloch, J.A., Mamizuka, E.M., Moraes, A.D.C.L., Faveri, M., Figueiredo, L.C., Duarte, P.M., Feres, M. 2018. Do different probing depths exhibit striking differences in microbial profiles? *J Clin Periodontol*, 45(1), 26-37.
- Petersen, C., Ronda, J.L. 2014. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*, 16, 1024-1033.
- Pianeta, R., Iniesta, M., Castillo, D.M., Lafaurie, G.I., Sanz, M., Herrera, D. 2021. Characterization of the Subgingival Cultivable Microbiota in Patients with Different Stages of Periodontitis in Spain and Colombia. A Cross-Sectional Study. *Microorganisms*, 9(9), 1940.
- Pomes, C.E., Bretz, W.A., de Leon, A., Aguirre, R., Milian, E., Chaves, E.S. 2000. Risk indicators for periodontal diseases in Guatemalan adolescents. *Braz Dent J*, 11, 49-57.
- Rams, T.E., Feik, D., Listgarten, M.A., Slots, J. 1992. Peptostreptococcus micros in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 7, 1-6.
- Ramseier, C., Mirra, D., Schütz, C., Sculean, A., Lang, N. P., Walter, C., Salvi, G. E. 2015. Bleeding on probing as it relates to smoking status in patients enrolled in supportive periodontal therapy for at least 5 years. *J Clin Periodontol*, 42, 150-159.
- Relman, D.A. 2002. New technologies, human–microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *J Infect Dis*, 186(2), S254-S258.
- Renson, A., Jones, H.E., Beghini, F., Segata, N., Zolnik, C.P., Usyk, M., Moody, T.U., Thorpe, L., Burk, R., Waldron, L., Dowd, J.B. 2019. Sociodemographic variation in the oral microbiome. *Ann Epidemiol*, 35, 73-80.
- Salam, M.A., Sato, M., Hoshino, E. 2001. Intraperitoneal immune cell responses to *Eubacterium saphenum* in mice. *Microbiol Immunol*, 45(1), 29-37.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(12), 5463-5467.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A.J., Herrera, D., DelleMijn-Kippuw, N., Simon, R., Winkel, E. 2000.

- Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci*, 108, 383-392.
- Schincaglia, G.P., Hong, B.Y., Rosania, A., et al. 2017. Clinical, immune, and microbiome traits of gingivitis and peri-implant mucositis. *J Dent Res*, 96(1), 47-55.
- 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. *Arch Oral Biol*, 99, 169-176.
- Shi, M., Wei, Y., Hu, W., Nie, Y., Wu, X., Lu, R. 2018. The Subgingival Microbiome of Periodontal Pockets with Different Probing Depths in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 124.
- Sizova, M.V., Hohmann, T., Hazen, A., Paster, B.J., Halem, S.R., Murphy, C.M., Panikov, N.S., Epstein, S.S. 2012. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 78(1), 94-203.
- Slots, J. 2017. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000*, 75, 7-23.
- Slots, J., Rams, T.E., Feik, D., Taveras, H.D, Gillespie, G.M. 1991. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol*, 62, 543-547.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-144.
- Stark, R., Grzelak, M., Hadfield, J. 2019. RNA sequencing: The teenage years. *Nat Rev Genet*, 20(11), 631-656.
- Syed, S.A., Loesche, W.J. 1972. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol*, 24, 638-644.
- Szafranski, S.P., Wos-Oxley, M.L., Vilchez-Vargas, R., et al. 2015. High-resolution taxonomic profiling of the subgingival microbiome for biomarker discovery and periodontitis diagnosis. *Appl Environ Microbiol*, 81(3), 1047-1058.
- Tanaka, M., Hanioka, T., Takaya, K., Shizukuishi, S. 1998. Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation. *J Periodontol*, 69(10), 1127-1130.

- Tanner, A.C. 2015. Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. *J Oral Biosci*, 57, 18-26.
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., Haffajee, A. 2013. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000*, 62, 95-162.
- Tonetti M., Sanz, M. 2019 a. Periodontitis: clinical decision tree for staging and grading. Guidance for clinicians. *EFP*.
- Tonetti M., Sanz, M. 2019 b. Periodontitis. Guidance for clinicians. *EFP*.
- Tonetti, M.S., Greenwell, H., Kornman, K.S. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*, 45(20), S149-S161.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E.S., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J.L., Tringe, S.G. 2015. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol*, 6, 771.
- Trichopoulou, A., Martínez-González, M. A., Tong, T. Y., Forouhi, N. G., Khandelwal, S., Prabhakaran, D., Mozaffarian, D., de Lorgeril, M. 2014. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC med*, 12, 112.
- Trombelli, L., Farina, R. 2013. A review of factors influencing the incidence and severity of plaque-induced gingivitis. *Minerva Stomatol*, 62, 207-234.
- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., Tatakis, D. N. 2018. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J periodontol*, 89(1), S46-S73.
- 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. *J Microbiol Immunol Infect*, 51(2), 226-234.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J.L., Slots, J. 1998. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol*, 69, 1111-1118.
- van Dalen, P.J., van Winkelhoff, A.J., van Steenberghe, T.J. 1998. Prevalence of Peptostreptococcus micros morphotypes in patients with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 13, 62-64.

- van der Velden, U. 2017. What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness? *Periodontol 2000*, 75, 24-44.
- van der Velden, U., Kuzmanova, D., Chapple, I.L.C. 2011. Micronutritional approached to periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 38(11), 142-158.
- van Winkelhoff, A.J., Bosch-Tijhof, C.J., Winkel, E.G., van der Reijden, W.A. 2002 a. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol*, 72, 666-671.
- van Winkelhoff, A.J., Loos, B.G., van der Reijden, W.A., van der Velden, U. 2002 b. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 29, 1023-1028.
- van Winkelhoff, A.J., Rurenga, P., Wekema-Mulder, G.J., Singadji, Z.M., Rams, T.E. 2016. Non-oral gram-negative facultative rods in chronic periodontitis microbiota. *Microb Pathog*, 94, 117-122.
- Vartoukian, S.R., Downes, J., Palmer, R.M., Wade, W.G. 2013. Fretibacterium fastidiosum gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(2), 458-463.
- Vartoukian, S.R., Moazzez, R.V., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Wade, W.G. 2016. First cultivation of health-associated Tannerella sp. HOT-286 (BU063). *J Dent Res*, 95, 1308-1313.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G. 2010. Cultivation of a Synergistetes strain representing a previously uncultivated lineage. *Environ Microbiol*, 12, 916-928.
- Vianna, M.E., Horz, H.P., Gomes, B.P., Conrads, G. 2005. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*, 20, 253-258.
- Victor, L.V., Cortelli, S.C., Aquino, D.R., de Carvalho Filho, J., Cortelli, J.R. 2008. Periodontal profile and presence of periodontal pathogens in young African-Americans from Salvador, Ba, Brazil. *Braz J Microbiol*, 39, 226-232.
- Vieira, E.M., Raslan, S.A., Wahasugui, T.C., Avila-Campos, M.J., Marvulle, V., Gaetti-Jardim

- Junior, E. 2009. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilian Indians from Umutina Reservation, Mato Grosso, Brazil. *J Appl Oral Sci*, 17, 440-445.
- von Elm, E., Altman, D.G., Egger, M., Pocock, S.J., Gotsche, P.C., Vandenbroucke, J.P. 2014. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg*, 12, 1495-1499.
- Wade WG. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*, 69(1), 137-43.
- Wade, W.G. 1996. The Role of Eubacterium Species in Periodontal Disease and Other Oral Infections. *Microb Ecol Health Dis*, 9(6), 367-70.
- Wang, J., Qi, J., Zhao, H., et al. 2013. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci Rep*, 3, 1843.
- Warnakulasuriya, S., Dietrich, T., Bornstein, M.M., et al. 2010. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J*, 60, 7-30.
- Wei, Y., Shi, M., Zhen, M., Wang, C., Hu, W., Nie, Y., Wu, X. 2019. Comparison of Subgingival and Buccal Mucosa Microbiome in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol*, 9, 53.
- Weinstock, G.M. 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489(7415), 250-6.
- White, D. A., Tsakos, G., Pitts, N. B., Fuller, E., Douglas, G. V., Murray, J. J. Steele, J. G. 2012. Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact on the population. *Br Dent J*, 213, 567-572.
- WHO. 1997. Oral health surveys: basic methods 4th edition. Geneva: World Health Organization.
- Wright, D.M., McKenna, G., Nugent, A., Winning, L., Linden, G.J., Woodside, J.V. 2020. Association between diet and periodontitis: a cross-sectional study of 10,000 NHANES participants. *Am J Clin Nutr*, 112(6), 1485-1491.
- Zhuang, L.F., Watt, R.M., Steiner, S., Lang-Hua, B.H., Wang, R., Ramseier, C.A., Lang, N.P. 2014. Subgingival microbiota of Sri Lankan tea labourers naïve to oral hygiene measures. *J Clin Periodontol*, 41, 433-441.

11. ANEXOS

A magnifying glass icon with a dark grey handle and a circular lens. The lens is positioned over the word 'ANEXOS', specifically focusing on the letters 'OS'.



Article

Characterization of the Subgingival Cultivable Microbiota in Patients with Different Stages of Periodontitis in Spain and Colombia. A Cross-Sectional Study

Roquelina Pianeta ^{1,2,*}, Margarita Iniesta ^{1,*}, Diana Marcela Castillo ³, Gloria I. Lafaurie ³, Mariano Sanz ¹ and David Herrera ¹

- ¹ ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal and Peri-Implant Diseases) Research Group, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain; rpianeta@ucm.es (R.P.); marsan@ucm.es (M.S.); davidher@ucm.es (D.H.)
- ² School of Dentistry, Corporación Universitaria Rafael Núñez (CURN), 10003 Cartagena, Colombia
- ³ Unit of Basic Oral Investigation (UIBO), School of Dentistry, Universidad El Bosque (UEB), 110121 Bogotá, Colombia; castillodiana@unbosque.edu.co (D.M.C.); lafauriegloria@unbosque.edu.co (G.I.L.)
- * Correspondence: margaini@ucm.es



Citation: Pianeta, R.; Iniesta, M.; Castillo, D.M.; Lafaurie, G.I.; Sanz, M.; Herrera, D. Characterization of the Subgingival Cultivable Microbiota in Patients with Different Stages of Periodontitis in Spain and Colombia. A Cross-Sectional Study. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1940. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091940>

Academic Editor:
Sofia Costa-de-Oliveira

Received: 28 July 2021
Accepted: 11 September 2021
Published: 12 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The objective was to characterize and compare the subgingival microbiota in patients diagnosed according to the World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions 2018. For this cross-sectional study, Spanish and Colombian subjects (characterized as health/gingivitis, periodontitis in stages I-II or stages III-IV) were clinically assessed, and subgingival samples were taken and processed by culture. The comparisons among patients with periodontal status (and between countries) was made using Mann–Whitney, Kruskal–Wallis, ANOVA and chi-square tests. The final sample consisted of 167 subjects. *Eikenella corrodens* and *Parvimonas micra* were more frequently detected in health/gingivitis and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis ($p < 0.05$). Higher total counts were observed in Colombia ($p = 0.036$). In Spain, significantly higher levels of *P. gingivalis* and *Campylobacter rectus* were observed, and of *Tannerella forsythia*, *P. micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus* and *Capnocytophaga* spp. in Colombia ($p < 0.001$). *P. micra* was more prevalent in health/gingivitis and stage I-II periodontitis in Colombia, and *P. gingivalis* in all periodontitis groups in Spain ($p < 0.05$). As conclusions, significant differences were detected in the microbiota between health/gingivitis and periodontitis, with minor differences between stages of periodontitis. Differences were also relevant between countries, with Colombia showing larger counts and variability of bacterial species.

Keywords: periodontitis; subgingival microbiota; microbiological culture; Spain; Colombia

1. Introduction

Periodontitis is a multifactorial chronic inflammatory disease [1,2], with a complex polymicrobial aetiology [3,4]. This disease is highly prevalent affecting large proportions of adults in different populations, depending on economic, cultural, social, and ethnic factors [5,6]. Periodontitis has recently been classified in stages and grades following the criteria of the World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions [1,2].

Bacterial communities organized in subgingival biofilms are the primary etiological factor of periodontitis [7,8]. These bacterial communities mainly result from ecological changes in their structure and the increase in total microbial biomass [3]. More than 700 different bacterial species have been identified in the subgingival microbiota [7,9,10], among which some have an effect on the general community that is much greater than the biomass they occupy, called key pathogens [3,11]. It is believed that some of these pathobionts, despite being present in low abundance in periodontitis, would produce the

maturation of potentially pathogenic communities [3,4,11], which would transform a symbiotic microbiota into a dysbiotic one, breaking homeostasis and producing inflammation and tissue destruction [4,11].

However, studies evaluating the composition of the subgingival microbiota have resulted in a high heterogeneity, probably due to the variability in the case definitions used to select periodontitis patients [12] and sociodemographic or geographic differences [9,13], including differences in ethnicity of the populations evaluated [14] or in the age [15]. In fact, previous investigations from our research groups have reported significant differences in the prevalence and proportions of periodontal pathogens when comparing different geographical areas, using the same microbiological diagnostic techniques [13,16–19]. In these studies, a comparison between the periodontal microbiota of Dutch and Spanish patients was presented, and a lower prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was observed in Spain [19]. When Spanish and Colombian patients were compared, *Porphyromonas gingivalis* was more frequent in periodontitis in Spanish patients than in Colombian patients [13]. Thus, the hypothesis arose that the present study could also be able to find differences between the studied populations, although this has to be confirmed using the criteria of the current classification.

Molecular selective techniques, including checkerboard DNA–DNA hybridization, real-time polymerase chain reaction (PCR), human oral microbe identification microarrays (HOMIM), oligonucleotide DNA–DNA hybridization, RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT), and techniques that allow the sequencing of the entire genome, such as pyrosequencing or next-generation sequencing (NGS) [7,12] have contributed to the characterization of periodontal microbiota, but its exclusive use could result in incomplete data on microbial diversity and, therefore, it is important to have parallel culture libraries [7,20]. Despite the fact that molecular detection techniques have greatly contributed to the knowledge of the periodontal microbiota, different studies criticize the total dependence on this type of tests, because they may underestimate a century of culture history. It has been proven that the culture is able to better detect bacterial diversity, compared to molecular methods, in addition to allowing the operator to see what has not been amplified. Perhaps, due to the analysis of the aforementioned, some researchers have turned to the use of the culture alone or in combination with other bacterial characterization techniques [7]. Due to the introduction of more competent anaerobic handling and incubation procedures, the culture is reinvented every day [17]. Thus, among many new perspectives, culture has become the basis for a high-throughput microbiological test alternative (culturomics) that have already been used in the identification of oral pathogens [21]. That is why cultivation continues to be an interesting alternative for microbiological testing [22].

The advent of the new classification of periodontitis in stages and grades [1], facilitates an adequate categorization of periodontitis patients and highlights the need of characterizing the subgingival microbiota using different microbiological methods, including anaerobic culture [21] that allows for comparisons with classical studies of prevalence and relative proportions of well-established periodontal pathogens [23].

Hence, the objective of the present study was to characterize and compare the subgingival cultivable microbiota, according to the criteria of the 2018 classification of periodontitis cases, in subjects from two different geographical locations (Spain and Colombia).

2. Materials and Methods

The present cross-sectional study was approved by the local ethical committees (references 18/127-E in Spain and 012-2018 in Colombia), and all recruited patients granted their authorization by signing the approved informed consent. All aspects of the Helsinki Declaration regarding experimentation involving human beings were considered. This manuscript follows the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) guidelines for reporting cross-sectional studies [24].

2.1. Subjects

The study was carried out in subjects attending the clinics of the Dental Schools at El Bosque University (UIBO) in Bogotá, Colombia, and University Complutense of Madrid (UCM), Spain. Patients were selected from April 2018 to March 2020, according to the following criteria:

2.1.1. Inclusion Criteria

Adults from 30 to 60 years old were included in the study, categorized by their periodontal conditions, according to the following criteria:

- Health and gingivitis subjects, as controls. No clinical attachment loss (CAL) nor radiographical bone loss (RBL) and probing depths (PD) ≤ 3 mm, assuming no pseudo pockets [25].
- Periodontitis in stages I or II. Following the criteria for severity, interdental CAL of 1–2 mm (stage I) or 3–4 mm (stage II) and RBL affecting only the coronal third of the root ($<15\%$ for stage I and 15–33% for stage II) [2].
- Periodontitis in stages III or IV. Following the criteria for severity, interdental CAL ≥ 5 mm and RBL extending to middle or apical third of the root. There should be evidence of tooth loss ≤ 4 teeth due to periodontal reasons in stage III, and ≥ 5 teeth in stage IV [2]. If needed, and using the criteria for complexity, furcation involvement class II or III.

2.1.2. Exclusion Criteria

- Periodontal treatment in the previous year.
- Acute periodontal conditions such as periodontal abscesses or necrotizing periodontal diseases, at the time of the screening.
- Having taken antibiotics in the previous 3 months.
- Systemic diseases or conditions (diabetes, quantitative and/or qualitative polymorphonuclear neutrophil defects, other immune system disorders).
- Pregnant women.
- Chronic use of anti-inflammatories, anticonvulsants, immunosuppressants, calcium channel blockers, upon sample collection for the study, or 6 months prior to the study.

2.2. Study Visit

Socio-demographic variables, such as age, gender, country and smoking habits, were registered. A medical questionnaire was carried out and if inclusion and exclusion criteria were fulfilled, patients were verbally informed about the study purpose and procedures, and they were asked to participate and, upon acceptance, to sign an informed consent. Each patient received a complete periodontal and radiographic examination (panoramic and/or periapical radiographs) and microbiological samples were taken.

2.3. Clinical Variables

Measurements were performed at six sites per tooth in all teeth, except third molars, with a UNC-15 periodontal probe (HuFriedy, Leinmen, Germany) by two calibrated examiners, one in each country. Clinical measurement from dental implants were not included in the analyses. All participants were clinically examined, including the following parameters, in order of registration:

- Gingival recession (REC), measured as the distance from the cemento-enamel junction (CEJ) to the gingival margin and recorded to the nearest millimetre.
- PD, measured from the gingival margin to the bottom of the sulcus/pocket and recorded to the nearest millimetre.
- CAL, measured as the distance from the bottom of the pocket to the CEJ.
- Bleeding on probing (BoP), measured after probing to the base of the pocket and expressed as a percentage [26].

- Plaque index (PII), evaluated by the presence of visible dental plaque, disclosed by erythrosine staining (Plac-Control[®], Dentaïd, Barcelona, Spain) and expressed as a percentage [27].

2.4. Microbiological Variables

2.4.1. Microbiological Sampling

Samples were taken from four selected sites, by means of two consecutive standardized 30# sterile paper points (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) per site. Paper points were inserted into the crevice or pocket and left in place for 10 s. Prior to sampling, supragingival plaque was removed from the sampling site followed by isolation from saliva with the use of cotton rolls and compressed air. All paper points were transferred into a screw-capped vial, containing 1.5 mL of reduced transport fluid (RTF) [28] and sent to the microbiological laboratories of each centre within 24 h. Sampling sites were selected as follows:

- In healthy / gingivitis subjects, subgingival samples were taken from the mesio-buccal sites of the first molars and, when absent, from the adjacent second molars (the next alternative was the second premolars and from there, any teeth present mesially).
- In subjects with periodontitis, subgingival samples were taken from the most accessible site with the deepest PD and BoP, per quadrant.

2.4.2. Microbiological Processing

At the laboratories (UCM, UIBO), samples were homogenized by vortexing for 30 s, four serial dilutions in phosphate buffer saline (PBS) were performed, and 100 µL were placed on: (i) non-selective blood agar medium (Blood Agar Base II, Oxoid, Basingstoke, U.K.), supplemented with haemin (5 mg/L), menadione (1 mg/L) and 5% sterile horse blood for determination of total anaerobic counts and for the identification of most target pathogens; and (ii) onto the selective medium Dentaïd-1 [29] for isolation and quantification of *A. actinomycetemcomitans*. Blood agar plates were incubated for 14 days in anaerobic conditions (80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂) at 37 °C, and selective agar plates were incubated for 3 days in air with 5% CO₂ at 37 °C. After incubation, initial identification of target species was done using colony morphology, and suspected colonies were further identified by microscope, Gram-staining and enzyme activity. Counts of representative colonies (those with colony morphologies compatible with target pathogen morphology) were carried out. Counting was performed in plates with 30–300 colonies.

2.5. Statistical Analysis

2.5.1. Calibration

Clinical parameters were evaluated by two calibrated examiners. An intra-examiner calibration was performed by recording duplicate measurements of PD and CAL in three patients, twice during the same visit, with 30 min intervals and intra-class reproducibility was calculated. The interclass correlation coefficient (ICC) showed an 86.3% of agreement for PD and 84.7% for CAL in Spain, and 90.2% and 89%, respectively, in Colombia.

2.5.2. Sample Size Calculation

The selected outcome variable to calculate the sample size was counts of *P. gingivalis*. Based on an expected difference between healthy / gingivitis and periodontitis groups in the mean of counts (expressed as colony forming units, CFU, 2900), with a standard deviation (SD) of 3008.75 [30], an alpha error of 0.05 and a power of 90%, 30 patients per group were necessary. Besides, and in order to narrow differences between different age groups in different conditions, the overall sample followed a uniform stratified sampling, in which the same size for all the defined strata was assigned. The desired sampling distribution was 30 patients for each periodontal status group (healthy and gingivitis, periodontitis in stages I or II, periodontitis in stages III or IV), and 10 patients for each age cohort (30–40 years, 41–50 years, 51–60 years, within each periodontal status category).

2.5.3. Statistical Analysis

For continuous data, Kolmogorov-Smirnov test and distribution of data were used to assess normality. Clinical and microbiological data were calculated by patient and then by periodontal status group and country. The logarithmic transformation of CFU of bacterial counts was designed to normalize the data distribution. Data were expressed as means and SD, and as median and interquartile ranges (IR) for non-parametric data. Categorical data were expressed as percentages.

Periodontal status- and country-level analyses were performed. For periodontal status-level analysis, demographic data were analysed by ANOVA test for continuous variables and chi-square test for categorical data, with probability values adjusted with the Bonferroni correction, and *p*-values were multiplied by the number of comparisons (three for periodontal status and fifteen for periodontal status by country). Clinical and microbiological variables were compared by ANOVA test, for parametric data, or Kruskal–Wallis test with Dunn–Bonferroni post hoc tests, for non-parametric data. For categorical data, chi-square test was used, with Bonferroni correction for multiplicity when was necessary. For country-level analysis, continuous demographic variables were compared with *t* test for parametric data, or U Mann–Whitney test for non-parametric data, and chi-square tests were used for categorical variables.

A stepwise forward logistic regression was performed to explore the relationship between the frequency of bacteria detection (yes/no) and the covariables of country, smoking, periodontal status and age. Periodontal health status (healthy/gingivitis, periodontitis stages I-II, periodontitis stages III-IV) was introduced as dummy variables. A second comparison with a stratification by age range was performed with country, smoking and periodontal status as covariables. Odds ratios (OR) together with the 95% confidence intervals (CI) were calculated. All statistical analyses were performed using SPSS 20 program package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the level of significance was set in 0.05.

3. Results

3.1. Study Population

A total of 199 patients were initially recruited, but four patients in Spain and 25 in Colombia were excluded. The reasons for exclusion in Spain were age or technical problems, and in Colombia, presenting systemic diseases, age, and having taken antibiotics in the last three months. The final sample consisted of 167 patients (Spain *n* = 90 and Colombia *n* = 77): 30 and 18, respectively, with periodontal health and gingivitis; 30 and 23, respectively, with periodontitis in stages I-II; and 30 and 36, respectively, with periodontitis in stages III-IV. In each group, three age ranges were considered: 30–40, 41–50 and 51–60 years (Table 1). Socioeconomic status was not specifically assessed. Only patients of Spanish origin (from Spain–Caucasian ethnicity) and only patients of Colombian origin (from Colombia–mixed ethnicity) were selected. Only two patients (in Spain) have received periodontal treatment in the past (subgingival instrumentation), with no supportive periodontal care for at least 3 years.

Table 1. Selected subjects (*n*, number of patients) according to country, periodontal status group and age.

	Periodontal Status	Age	Spain (<i>n</i>)	Colombia (<i>n</i>)
Selected subjects by country			90	77
Selected subjects by periodontal status group and country	Health and Gingivitis		30	18
	Periodontitis I-II		30	23
	Periodontitis III-IV		30	36

Table 1. Cont.

	Periodontal Status	Age	Spain (n)	Colombia (n)
Selected subjects by periodontal status group, age and country	Health and Gingivitis	30–40	10	7
		41–50	10	5
		51–60	10	6
	Periodontitis I-II	30–40	10	11
		41–50	10	6
		51–60	10	6
		30–40	10	11
	Periodontitis III-IV	41–50	10	16
		51–60	10	9

No statistically significant differences in age ($p = 0.170$), gender ($p = 0.409$) and smoking habit ($p = 0.064$), among groups according to their periodontal status, were observed (Table 2). When comparing subjects from different countries, no significant differences in age ($p = 0.242$), or gender ($p = 0.972$) were detected, but a significantly lower percentage of smokers in Colombian patients (9.1%), when compared with Spanish patients (26.7%), was evidenced ($p = 0.004$). When comparing the impact of both periodontal status and country, no significant differences were observed for age and gender, while a statistically significant higher percentage of smokers, in Spanish versus Colombian subjects, was observed in stage I-II periodontitis (30.0% versus 4.3%, respectively) ($p = 0.031$) and stage III-IV periodontitis (40.0% versus 11.1%, respectively) ($p = 0.006$), when compared to Colombian patients for the same periodontal status groups.

3.2. Clinical Outcome Variables

Statistically significant differences were observed among periodontal status groups, both for mean CAL, BoP and PD, as well as for the proportion of pockets in the categories 1–3 mm and 4–5 mm ($p < 0.001$). For the proportion of deep pockets (≥ 6 mm), significant differences were only detected when comparing health-gingivitis with periodontitis I-II ($p < 0.001$), and periodontitis I-II with periodontitis III-IV ($p < 0.001$). PII only presented statistically significant differences when comparing health-gingivitis with periodontitis I-II and with periodontitis III-IV ($p < 0.001$) (Table 3). The grade distribution of periodontitis did not show any difference among grades or between countries (Table S1).

When assessing periodontal status and country, statistically significant higher means in PD ($p = 0.037$) and BoP ($p < 0.001$), were observed in Colombian subjects in stages I-II periodontitis group, and statistically significant higher BoP values were also observed in stages III-IV periodontitis ($p = 0.024$). Conversely, higher PII ($p < 0.001$) in health/gingivitis group was observed in Spain (Table 3).

Statistically significant differences were observed among periodontal status groups, both for mean CAL, BoP, and PD, as well as for the proportion of pockets in the categories 1–3 mm and 4–5 mm ($p < 0.001$). For the proportion of deep pockets (≥ 6 mm) significant differences were only detected when comparing health-gingivitis with periodontitis I-II ($p < 0.001$), and periodontitis I-II with periodontitis III-IV ($p < 0.001$). PII only presented statistically significant differences when comparing health-gingivitis with periodontitis I-II and with periodontitis III-IV ($p < 0.001$) (Table 3). The clinical characteristics of the sampled sites were similar for all periodontal status and for both countries, except for PII, which showed significantly higher levels in the health-gingivitis group in Spain than in Colombia ($p < 0.001$) (Table S2).

Table 3. Comparison of clinical parameters between countries (first comparison) and among periodontal status groups (second comparison).

	Health and Gingivitis ^a				Periodontitis I-II ^a			Periodontitis III-IV ^a			Second Comparison (among Periodontal Status ^b)
	First Comparison	n	Mean (SD)	p Value	n	Mean (SD)	p Value	n	Mean (SD)	p Value	p Value
PD (mm)	Spain	30	2.26 (0.31)	0.359	30	2.90 (0.39)	0.037	30	4.04 (0.76)	0.069	<0.001
	Colombia	18	2.17 (0.27)		23	3.19 (0.57)		36	3.72 (0.65)		
PD 1–3 mm (%)	Spain	30	98.37 (3.14)	0.148	30	77.38 (14.17)	0.073	30	43.08 (21.77)	0.083	<0.001
	Colombia	18	94.83 (12.62)		23	68.42 (21.38)		36	50.19 (9.73)		
PD 4–5 mm (%)	Spain	30	1.60 (3.12)	0.145	30	20.78 (12.71)	0.110	30	38.04 (14.06)	0.170	<0.001
	Colombia	18	5.16 (12.62)		23	24.07 (17.07)		36	33.41 (13.00)		
PD ≥ 6 mm (%)	Spain	30	0.01 (0.10)	0.445	30	1.82 (2.06)	0.174	30	18.86 (14.52)	0.424	<0.001, Health and Gingivitis <i>versus</i> Periodontitis III-IV <0.001, Periodontitis I-II <i>versus</i> Periodontitis III-IV
	Colombia	18	0		23	3.19 (4.91)		36	16.36 (10.66)		
CAL (mm)	Spain	30	0.33 (0.24)	0.521	30	3.07 (0.39)	0.660	30	4.78 (0.85)	0.237	<0.001
	Colombia	18	0.28 (0.26)		23	3.16 (0.96)		36	4.52 (0.93)		
BoP (%)	Spain	30	15.53 (15.01)	0.251	30	32.71 (17.01)	<0.001	30	63.87 (26.33)	0.024	<0.001
	Colombia	18	10.94 (9.45)		23	68.82 (38.93)		36	79.69 (28.65)		
PII (%)	Spain	30	50.97 (25.07)	<0.001	30	62.69 (25.59)	0.736	30	76.00 (24.20)	0.465	<0.001, Health and Gingivitis <i>versus</i> Periodontitis I-II <0.001, Health and Gingivitis <i>versus</i> Periodontitis III-IV
	Colombia	18	22.77 (13.78)		23	65.86 (38.77)		36	70.27 (36.49)		

Probing depth (PD); clinical attachment level (CAL); bleeding on probing (BoP); plaque index (PII). SD, standard deviation; n, number of patients. ^a, Student t test. ^b, One-way ANOVA test.

Table 2. Description of the sample population characteristics (demographic variables and smoking habit), and comparisons according to periodontal status and country.

Comparison	First Comparison	Second Comparison	Age ^a			Gender ^b				Smoking ^b			p Value		
			n	Mean (SD)	p Value	n	Female %	n	Male %	p Value	n	Non Smokers %		n	Smokers %
Periodontal status group	Health and Gingivitis		48	45.13 (9.71)	0.170	26	54.2	22	45.8	0.409	43	89.6	5	10.4	0.064
	Periodontitis I-II		53	43.72 (8.77)		30	56.6	23	43.4		43	81.1	10	18.9	
	Periodontitis III-IV		66	45.32 (8.00)		31	47.0	35	53.0		50	75.8	16	24.2	
Periodontal status by country	Health and Gingivitis	Spain	30	44.97 (8.28)	0.588	16	53.3	14	46.7	1.000	27	90.0	3	10.0	0.045, Periodontitis I-II (Colombia) versus Periodontitis III-IV (Spain)
		Colombia	18	45.39 (11.99)		10	55.6	8	44.4		16	88.9	2	11.1	
	Periodontitis I-II	Spain	30	45.17 (8.04)		16	53.3	14	46.7		21	70.0	9	30.0	
		Colombia	23	41.83 (9.49)		14	60.9	9	39.1		22	95.7	1	4.3	
	Periodontitis III-IV	Spain	30	46.33 (8.25)		15	50.0	15	50.0		18	60.0	12	40.0	
		Colombia	36	44.47 (7.81)		16	44.4	20	55.6		32	88.9	4	11.1	

SD, standard deviation; n, number of patients. ^a, One-way ANOVA test. ^b, chi-square test with Bonferroni correction.

3.3. Subgingival Cultivable Microbiota-Total Anaerobic Counts

Statistically significant lower total anaerobic counts were observed for the health/gingivitis group, when compared with stages I-II periodontitis ($p = 0.029$), and stages III-IV periodontitis ($p = 0.010$). Overall, significantly higher counts were observed in Colombian patients ($p = 0.036$), together with a lower range of variability. When comparing the impact of both periodontal status and country, statistically significant higher counts were observed in Colombia for the health/gingivitis group ($p = 0.001$), when compared with Spain (Table 4).

3.4. Subgingival Cultivable Microbiota-Periodontal Pathogens

Overall, the most frequently detected bacterial species were *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Capnocytophaga* spp., and *Actinomyces odontolyticus*. These pathogenic species, together with *Fusobacterium nucleatum* were also present in relatively high counts and proportions. *A. actinomycetemcomitans* was not detected in any of the samples studied. Statistically significant higher counts, proportions, and frequency of detection of *P. gingivalis* for, stages I-II periodontitis when compared with health/gingivitis ($p \leq 0.05$), were observed. The opposite was true for *Eikenella corrodens*, with lower values and frequency of detection in stages III-IV periodontitis, when compared with health/gingivitis ($p \leq 0.05$). In addition, *P. micra* showed statistically significant lower counts ($p = 0.006$), proportions ($p = 0.009$) and frequency of detection ($p = 0.009$), in periodontitis stages III-IV, as compared with health/gingivitis (Table 5). When comparing countries, statistically significant higher counts, proportions, and frequency of detection of *P. gingivalis* and *Campylobacter rectus* were observed in Spain ($p < 0.001$). Conversely, samples from Colombian patients showed significant higher counts, proportions, and frequency of detection of *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp. and *A. odontolyticus* ($p < 0.001$), and counts and proportions of *Prevotella intermedia* and *F. nucleatum* ($p \leq 0.05$) (Table 5). When assessing the impact of both periodontal status and country, for stages I-II periodontitis (Table S3), counts, and proportions of *F. nucleatum*, and proportions and frequency of detection of *P. micra*, *Capnocytophaga* spp. and *A. odontolyticus* were significantly higher in Colombian patients, compared with Spanish patients, who showed a higher frequency of detection of *P. gingivalis* ($p < 0.001$) and *P. intermedia* ($p = 0.014$), and higher counts, proportions, and detection frequencies of *E. corrodens* ($p \leq 0.05$). For stages III-IV periodontitis (Table S4), counts, proportions and frequency of detection of *Capnocytophaga* spp. and *A. odontolyticus* were higher in Colombia, in contrast to higher frequency of detection of *P. gingivalis* ($p \leq 0.05$) in Spain. In the health/gingivitis group (Table S5), significantly higher counts, proportions, and frequency of detection of *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp., and *A. odontolyticus*, in addition to higher counts of *F. nucleatum*, were observed in Colombia ($p \leq 0.05$).

Table 4. Comparison of total anaerobic counts (log transformed) among periodontal status groups (first comparison) and between countries (second comparison).

Comparison	First Comparison	Second Comparison	n	Mean (SD)	Mean Difference	95% CI		p Value ^a
						Lower Bound	Upper Bound	
Periodontal status group	Health and Gingivitis		48	6.29 (0.73)	−0.31 *	−0.60	−0.02	0.029
	Periodontitis I-II		53	6.60 (0.55)	−0.02 †	−0.29	0.24	1.000
	Periodontitis III-IV		66	6.63 (0.53)	−0.34 ‡	−0.61	−0.60	0.010
Country		Spain	90	6.43 (0.64)				
		Colombia	77	6.63 (0.56)	−0.20 §	−0.38	−0.01	0.036
Periodontal status by country	Health and Gingivitis	Spain	30	5.99 (0.67)	−0.80 §	−1.18	−0.43	<0.001
		Colombia	18	6.79 (0.51)				
	Periodontitis I-II	Spain	30	6.57 (0.46)				
		Colombia	23	6.66 (0.67)	−0.09 §	−0.40	0.22	0.565
	Periodontitis III-IV	Spain	30	6.74 (0.53)				
		Colombia	36	6.54 (0.51)	0.20 §	−0.05	0.46	0.115

SD, standard deviation; n, number of patients; CI, confidence interval. *, health and gingivitis group versus periodontitis I-II group. †, periodontitis I-II group versus periodontitis III-IV group. ‡, health and gingivitis group versus periodontitis III-IV group. §, Spain versus Colombia. ^a, ANOVA results in first comparison and t-test results in second comparison.

Table 5. Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species according to periodontal status and country. Counts and proportions were calculated considering all samples.

Periodontal Status (Group)	Country	Counts ^a				Proportions ^a				Frequency ^b	
		n	Mean (SD)	Median (IR)	p Value	n	Mean (SD)	Median (IR)	p Value	n (%)	p Value
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Health and Gingivitis	48	2.34 (2.66)	0.00 (5.48)	0.014 *	48	5.88 (12.22)	0.00 (6.75)	0.007 *	22 (45.8)	0.006 *
		53	4.15 (2.51)	5.00 (3.77)	1.000 †	53	14.57 (20.67)	3.72 (18.50)	0.512 †	40 (75.5)	0.123 †
		66	3.38 (2.97)	5.00 (6.07)	0.062 ‡	66	10.28 (15.08)	3.27 (17.29)	0.195 ‡	38 (57.6)	0.645 ‡
	Spain	90	4.34 (2.33)	5.12 (1.95)		90	13.28 (17.52)	5.83 (18.16)		72 (80.0)	
		77	2.14 (2.88)	0.00 (5.60)	<0.001 §	77	6.99 (14.93)	0.00 (5.06)	<0.001 §	28 (36.4)	<0.001 §
		77	2.14 (2.88)	0.00 (5.60)	<0.001 §	77	6.99 (14.93)	0.00 (5.06)	<0.001 §	28 (36.4)	<0.001 §

Table 5. Cont.

Periodontal Status (Group)	Country	Counts ^a				Proportions ^a				Frequency ^b		
		n	Mean (SD)	Median (IR)	p Value	n	Mean (SD)	Median (IR)	p Value	n (%)	p Value	
<i>Prevotella intermedia</i>	Health and Gingivitis	Spain	48	3.55 (2.48)	4.15 (5.78)	0.294	48	5.59 (8.59)	0.92 (5.22)	0.497	35 (72.9)	0.978 *
			53	3.95 (2.11)	4.69 (2.24)		53	4.97 (8.48)	0.90 (5.66)		43 (81.1)	1.000 †
			66	4.17 (2.30)	5.00 (1.95)		66	7.15 (10.24)	2.33 (12.11)		52 (78.8)	1.000 ‡
	Periodontitis I-II	Colombia	90	3.56 (2.14)	4.00 (2.77)	<0.001 §	90	3.16 (6.39)	0.66 (3.33)	<0.001 §	70 (77.8)	0.982 §
			77	4.35 (2.41)	5.43 (1.75)		77	9.35 (10.86)	5.11 (13.59)		60 (77.9)	
<i>Tannerella forsythia</i>	Health and Gingivitis	Spain	48	2.33 (2.73)	0.00 (5.58)	0.335	48	3.84 (7.10)	0.00 (5.31)	0.160	21 (43.8)	0.939 *
			53	1.72 (2.45)	0.00 (4.65)		53	0.89 (1.87)	0.00 (0.79)		18 (34.0)	1.000 †
			66	1.83 (2.47)	0.00 (4.81)		66	0.87 (1.77)	0.00 (1.02)		24 (36.4)	1.000 ‡
	Periodontitis III-IV	Colombia	90	1.40 (2.18)	0.00 (4.30)	<0.001 §	90	0.57 (1.63)	0.00 (0.65)	<0.001 §	27 (30.0)	0.026 §
			77	2.57 (2.78)	0.00 (5.60)		77	3.09 (5.79)	0.00 (3.70)		36 (46.8)	
<i>Parvimonas micra</i>	Health and Gingivitis	Spain	48	1.77 (2.57)	0.00 (5.03)	0.503 *	48	2.34 (6.27)	0.00 (2.41)	0.633 *	16 (33.3)	1.000 *
			53	1.19 (2.23)	0.00 (0.00)		53	1.57 (4.12)	0.00 (0.00)		12 (22.6)	0.225 †
			66	0.52 (1.55)	0.00 (0.00)		66	0.57 (2.54)	0.00 (0.00)		7 (10.6)	0.009 ‡
	Periodontitis III-IV	Colombia	90	0.42 (1.36)	0.00 (0.00)	<0.001 §	90	0.28 (1.59)	0.00 (0.00)	<0.001 §	8 (8.9)	<0.001 §
			77	1.88 (2.61)	0.00 (5.14)		77	2.70 (6.04)	0.00 (3.26)		27 (35.1)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Health and Gingivitis	Spain	48	4.48 (1.24)	4.69 (1.13)	0.111	48	3.63 (3.37)	2.58 (4.19)	0.951	46 (95.8)	0.822 *
			53	4.52 (1.74)	5.04 (1.08)		53	4.66 (5.53)	2.45 (5.15)		47 (88.7)	1.000 †
			66	4.54 (1.91)	5.00 (1.14)		66	8.24 (13.55)	2.65 (9.20)		58 (87.9)	0.564 ‡
	Periodontitis III-IV	Colombia	90	4.16 (1.58)	4.60 (1.04)	<0.001 §	90	2.58 (2.90)	1.95 (2.97)	<0.001 §	81 (90.0)	0.842 §
			77	4.94 (1.71)	5.39 (1.19)		77	9.52 (12.57)	4.17 (9.06)		70 (90.9)	

Table 5. Cont.

	Periodontal Status (Group)	Country	Counts ^a				Proportions ^a				Frequency ^b	
			n	Mean (SD)	Median (IR)	p Value	n	Mean (SD)	Median (IR)	p Value	n (%)	p Value
<i>Campylobacter rectus</i>	Health and Gingivitis	Spain Colombia	48	0.23 (0.91)	0.00 (0.00)	0.876	48	0.18 (0.88)	0.00 (0.00)	0.849	3 (6.3)	1.000 *
	Periodontitis I-II		53	0.20 (1.03)	0.00 (0.00)		53	0.53 (3.42)	0.00 (0.00)		2 (3.8)	1.000 †
	Periodontitis III-IV		66	0.20 (0.94)	0.00 (0.00)		66	0.07 (0.37)	0.00 (0.00)		3 (4.5)	1.000 †
			90	0.39 (1.28)	0.00 (0.00)	90	0.46 (2.70)	0.00 (0.00)	<0.001 §	8 (8.9)		
			77	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	<0.001 §	77	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	<0.001 §	0 (0.0)	0.008 §
<i>Eikenella corrodens</i>	Health and Gingivitis	Spain Colombia	48	1.03 (1.89)	0.00 (2.25)	0.048 *	48	0.35 (0.91)	0.00 (0.09)	0.039 *	12 (25.0)	0.051 *
	Periodontitis I-II		53	0.37 (1.18)	0.00 (0.00)	1.000 †	53	0.07 (0.37)	0.00 (0.00)	1.000 †	5 (9.4)	1.000 †
	Periodontitis III-IV		66	0.47 (1.53)	0.00 (0.00)	0.074 ‡	66	0.45 (1.85)	0.00 (0.00)	0.066 ‡	6 (9.1)	0.033 ‡
			90	0.66 (1.53)	0.00 (0.00)	0.343 §	90	0.19 (0.75)	0.00 (0.00)	0.355 §	15 (16.7)	
			77	0.53 (1.60)	0.00 (0.00)	0.343 §	77	0.43 (1.70)	0.00 (0.00)	0.355 §	8 (10.4)	0.241 §
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Health and Gingivitis	Spain Colombia	48	2.36 (2.74)	0.00 (5.43)	0.727	48	3.30 (6.31)	0.00 (4.24)	0.889	21 (43.8)	1.000 *
	Periodontitis I-II		53	2.55 (2.77)	0.00 (5.30)		53	4.94 (11.23)	0.00 (4.47)		25 (47.2)	1.000 †
	Periodontitis III-IV		66	2.31 (2.61)	0.00 (5.12)		66	4.14 (11.22)	0.00 (3.33)		30 (45.5)	1.000 ‡
			90	0.74 (1.68)	0.00 (0.00)	<0.001 §	90	0.15 (0.63)	0.00 (0.00)	<0.001 §	15 (16.7)	<0.001 §
			77	4.34 (2.31)	5.30 (1.39)	<0.001 §	77	8.83 (13.34)	4.17 (9.34)	<0.001 §	61 (79.2)	<0.001 §
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Health and Gingivitis	Spain Colombia	48	2.24 (2.94)	0.00 (5.71)	0.374	48	6.95 (10.96)	0.00 (12.56)	0.278	18 (37.5)	1.000 *
	Periodontitis I-II		53	2.14 (2.81)	0.00 (5.37)		53	5.82 (9.97)	0.00 (10.62)		20 (37.7)	0.399 †
	Periodontitis III-IV		66	2.14 (2.81)	4.15 (5.63)		66	10.48 (17.67)	0.65 (16.12)		34 (51.5)	0.414 ‡
			90	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	<0.001 §	90	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	<0.001 §	0 (0.00)	<0.001 §
			77	5.35 (1.59)	5.69 (1.24)	<0.001 §	77	17.33 (15.95)	13.87 (20.47)	<0.001 §	72 (93.5)	<0.001 §

n, number of patients; n (%), number and percentage of positive samples. *, health and gingivitis group versus periodontitis I-II group; †, periodontitis I-II group versus periodontitis III-IV group; ‡, health and gingivitis group versus periodontitis III-IV group; §, Spain versus Colombia. †, Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney test. ‡, chi-square with Bonferroni correction.

3.5. Impact of Periodontal Status, Country, Smoking and Age

The results of the binary logistic regression analyses are presented in Table 6 (only for species showing a reliable model). In the whole cohort, adjusted for country, smoking, periodontal status and age, *P. gingivalis* was significantly associated with Spanish subjects (OR = 10.48, 95% CI [4.59; 23.89], $p < 0.001$) in stages I-II (OR = 8.43, 95% CI [2.93; 24.19], $p < 0.001$) and stages III-IV (OR = 3.44, 95% CI [1.35; 8.78], $p = 0.010$) periodontitis. This greater probability of being detected in Spain is shown in the analysis by age strata, although the probability of *P. gingivalis* being detected in subjects from 51 to 60 years is higher in periodontitis groups than in health and gingivitis group. Conversely, *P. micra* was significantly associated with Colombian subjects (OR = 8.32, 95% CI [3.23; 21.45], $p < 0.001$) in health and gingivitis (OR = 7.68, 95% CI [2.53; 23.32], $p < 0.001$) and in stages I-II periodontitis (OR = 3.41, 95% CI [1.15; 10.05], $p = 0.026$). In addition, the probability of *P. micra* being detected increased in the 30–40-year-old stratum for Colombian subjects (OR = 10.58, 95% CI [2.33; 48.04], $p = 0.002$) with health and gingivitis (OR = 18.10, 95% CI [2.39; 137.02], $p = 0.005$) and with stages I-II periodontitis (OR = 7.91, 95% CI [1.25; 49.71], $p = 0.027$). *Capnocytophaga* spp. had also a higher probability of being detected in Colombia (OR = 19.0, 95% CI [8.72; 41.63], $p < 0.001$), and this probability is maintained in all age strata.

Table 6. Forward stepwise logistic regression analyses evaluating the detection of selected bacterial species considering country, smoking, periodontal status, and age as covariables in a first comparison with the whole cohort, and in a second comparison stratified by age ranges.

	Adjusted Model				95% CI			
	Whole Cohort	Stratification by Age Ranges		Coefficient	<i>p</i> Value	OR		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Spain			2.35	<0.001	10.48	4.59	23.89
	Periodontitis I-II			2.13	<0.001	8.43	2.93	24.19
	Periodontitis III-IV			1.23	0.010	3.44	1.35	8.78
		30–40 years	Spain	2.02	0.001	7.60	2.34	24.67
		41–50 years	Spain	1.91	0.002	6.80	2.07	22.29
		51–60 years	Spain	2.52	0.003	12.4	2.36	65.45
			Periodontitis I-II	2.69	0.010	14.7	1.90	114.05
			Periodontitis III-IV	2.08	0.027	8.01	1.26	50.83
<i>Parvimonas micra</i>	Colombia			2.12	<0.001	8.32	3.23	21.45
	Health and gingivitis			2.03	<0.001	7.68	2.53	23.32
	Periodontitis I-II			1.22	0.026	3.41	1.15	10.05
		30–40 years	Colombia	2.35	0.002	10.58	2.33	48.04
			Health and Gingivitis	2.89	0.005	18.1	2.39	137.02
			Periodontitis I-II	2.06	0.027	7.91	1.25	49.71
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Colombia			2.94	<0.001	19.0	8.72	41.63
		30–40 years	Colombia	3.44	<0.001	31.2	7.50	130.17
		41–50 years	Colombia	2.07	0.001	8.00	2.40	26.56
		51–60 years	Colombia	3.66	<0.001	39.0	7.72	195.71

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

4. Discussion

The present cross-sectional study revealed differences in the subgingival microbiota between periodontitis patients (higher counts and levels of *P. gingivalis*) and healthy /gingivitis subjects (higher levels of *E. corrodens* and *P. micra*), while minor differences were observed when comparing different stages of periodontitis. Conversely, relevant differences were

detected when comparing subjects from different countries, with Colombian subjects harbouring higher total counts and a larger bacterial variability than Spanish patients.

Despite the differences in terms of smoking, also reported in previous studies [13], the studied populations were comparable because the historical trends reinforce that tobacco does not seem to be a determinant in the periodontal status of the studied populations [5,31]. Despite this, the impact of smoking on the microbiological results of the present study cannot be ruled out since the impact of tobacco use in periodontitis has been clearly established [32], and may also influence the composition of the subgingival microbiota [33].

The selected populations were also comparable, since they were similar in terms of percentage of periodontal pockets and other clinical variables. All parameters showed, as expected, statistically significant differences among periodontal status groups. However, in Colombia, higher levels of BoP, specifically in periodontitis stages I-II and III-IV, and higher PD in periodontitis stages I-II were evident. In contrast, plaque levels were higher in Spain in the health/gingivitis group. As in previous studies, Colombian patients tended to present more severe clinical findings, with lower plaque levels [13]. It has been suggested that, in Colombian patients, low levels of plaque in deep pockets may be able to trigger high levels of inflammation [16], which may be conditioned by specific lifestyle conditions in developing countries [17] or by a specific genetic background in these patients [34].

Overall, the subgingival microbiota demonstrated differences between subjects with periodontal health/gingivitis (higher prevalence of *E. corrodens* and *P. micra*) and periodontitis (higher prevalence of *P. gingivalis*). While the pathogenic role of *P. gingivalis* has been clearly established as a bacterial species strongly associated with periodontitis [30], the findings for *E. corrodens* and *P. micra* are unexpected, especially for *P. micra*, which has also been considered as a periodontal pathogen with a moderate association with periodontitis [30,35–37].

The subgingival microbiota showed clear differences when comparing countries: Colombia, in addition to presenting higher total counts than Spain, also showed significantly higher counts, proportions, and frequency of detection of *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp., *A. odontolyticus*, and *P. intermedia*; conversely, significant higher counts, proportions, and frequency of detection of *P. gingivalis* and *C. rectus* were found in Spain. Colombian subjects harboured higher prevalence of *P. micra* in health/gingivitis and in periodontitis stages I-II., while in Spain, higher frequencies of detection of *P. gingivalis* were observed in periodontitis stages I-II and III-IV. When also considering age stratum, *P. micra* showed a stronger association with Colombian patients in health/gingivitis and periodontitis stages I-II groups between 30 and 40 years of age. These findings suggest that the microbiota of Colombian subjects is characterized by higher bacterial counts and larger variability, while a relevant role of *P. gingivalis* in periodontitis was observed in Spanish patients, in agreement with previous studies [13,19]. A possible hypothesis may suggest that, in Colombian subjects, dysbiotic biofilms could be associated with larger amounts and greater variety in the microbiota at specific ages [38], while in Spain, the impact of key pathogens could be more relevant [39,40], regardless of age. Conducting longitudinal studies are, therefore, justified to test this hypothesis, and to better understand the possible clinical relevance and the possible impact of using microbiological diagnosis in the context of personalized medicine.

The detected differences in the periodontal microbiota between countries, according to periodontal status, could be related to the influence of specific characteristics of different geographic populations on the bacterial composition [13,16,19,41,42]. Furthermore, the 2018 classification of periodontitis does not include different types of periodontitis but rather a single multidimensional entity [23], which might be associated with different microbial profiles when comparing populations.

Thus, specific treatments and therapeutic strategies may be selected for each profile (personalized medicine).

The present study has used culture techniques to evaluate the subgingival microbiota. As explained earlier, the exclusive use of molecular techniques could result in incom-

plete data on microbial diversity and, therefore, it is important to have parallel culture libraries [7,20]. In addition, with the introduction of more competent anaerobic handling and incubation procedures, the culture is reinvented every day [17], and it can be still considered as a relevant tool in the characterization of periodontal pathogens [22,43,44]. Microbiological culturing is not free of limitations [7,22], but it continues to be the gold standard for bacterial identification and the starting point for current molecular analyses [7,22]. However, bacterial culture is not capable of identifying some segments of the microbiota.

Other limitations of the present study should be acknowledged: the microbiological analysis of the study samples was carried out in parallel in two independent laboratories, although they were trained and calibrated in bacterial culture [13,19,41]; the relatively small sample size; and the differences in demographic (e.g., smoking) and clinical characteristics (plaque or bleeding levels) of the population studied. In addition, no information on socio-economic status was recorded, and patients were exclusively recruited at university clinics.

5. Conclusions

The present analysis, using the criteria of the 2018 classification, has observed significant differences when comparing the subgingival microbiota between periodontitis (higher levels of *P. gingivalis*) and health/gingivitis (higher levels of *E. corrodens* and *P. micra*), with minor differences between stages of periodontitis. Differences were also detected between countries, with Colombia showing larger bacterial counts and variability of bacterial species: *P. gingivalis* and *C. rectus* were the most relevant pathogens in Spain, while *T. forsythia*, *P. micra*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *A. odontolyticus*, and *Capnocytophaga* spp. were the most prevalent in Colombia.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9091940/s1>, Table S1: Distribution of periodontitis grades by country. Table S2: Clinical characteristics of the selected sites for subgingival sampling. Table S3: Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species according to country, in periodontitis in stages I-II patients. Table S4: Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species according to country, in periodontitis in stages III-IV patients. Table S5: Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species, according to country, in health and gingivitis subjects.

Author Contributions: Conceptualization, R.P., G.I.L., and D.H.; patient recruitment and sampling, R.P., M.I.; microbiological analyses, R.P., D.M.C.; validation, M.L., G.I.L., M.S. and D.H.; formal analysis, R.P., M.I. and D.H.; writing—original draft preparation, R.P., M.I., M.S. and D.H.; writing—review and editing R.P., M.I., M.S. and D.H.; supervision, G.I.L., M.S. and D.H.; project administration, R.P., M.I., G.I.L. and D.H.; funding acquisition, R.P., G.I.L., M.S. and D.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Minciencias/Colombia (grant number 130880763942), and Cátedra Extraordinaria DentaId de Investigación en Periodoncia, University Complutense of Madrid, Spain.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (2008) and approved by the Research Ethics Committees in Spain (reference 18/127-E) and in Colombia (reference 012-2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data available on request due to restrictions. Data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy and ethical issues.

Acknowledgments: We are grateful to the Faculties of Dentistry and to the microbiology laboratories of both, the Complutense University of Madrid and El Bosque University. Thanks to Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación-Minciencias, Colombia (grant number 130880763942), and

Cátedra Extraordinaria Dentaid de Investigación en Periodoncia, Complutense University of Madrid, Spain, for having supported the present study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Caton, J.G.; Armitage, G.; Berglundh, T.; Chapple, I.L.C.; Jepsen, S.; Kornman, K.S.; Mealey, B.L.; Papapanou, P.N.; Sanz, M.; Tonetti, M.S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions-Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45* (Suppl. 20), S1–S8. [[CrossRef](#)]
2. Papapanou, P.N.; Sanz, M.; Buduneli, N.; Dietrich, T.; Feres, M.; Fine, D.H.; Flemmig, T.F.; Garcia, R.; Giannobile, W.V.; Graziani, F.; et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45* (Suppl. 20), S162–S170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Abusleme, L.; Hoare, A.; Hong, B.Y.; Diaz, P.I. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol. 2000* **2021**, *86*, 57–78. [[CrossRef](#)]
4. Curtis, M.A.; Díaz, P.I.; Van Dyke, T.E. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol. 2000* **2020**, *83*, 14–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Carasol, M.; Llodra, J.C.; Fernandez-Meseguer, A.; Bravo, M.; Garcia-Margallo, M.T.; Calvo-Bonacho, E.; Sanz, M.; Herrera, D. Periodontal conditions among employed adults in Spain. *J. Clin. Periodontol.* **2016**, *43*, 548–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kassebaum, N.J.; Bernabe, E.; Dahiya, M.; Bhandari, B.; Murray, C.J.; Marcenes, W. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: A systematic review and meta-regression. *J. Dent. Res.* **2014**, *93*, 1045–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Teles, R.; Teles, F.; Frias-Lopez, J.; Paster, B.; Haffajee, A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol. 2000* **2013**, *62*, 95–162. [[CrossRef](#)]
8. Holt, S.C.; Ebersole, J.L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: The “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol. 2000* **2005**, *38*, 72–122. [[CrossRef](#)]
9. Haffajee, A.D.; Bogren, A.; Hasturk, H.; Feres, M.; Lopez, N.J.; Socransky, S.S. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J. Clin. Periodontol.* **2004**, *31*, 996–1002. [[CrossRef](#)]
10. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol. 2000* **2005**, *38*, 135–187. [[CrossRef](#)]
11. Hajishengallis, G.; Lamont, R.J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* **2012**, *27*, 409–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Montenegro, S.C.L.; Retamal-Valdes, B.; Bueno-Silva, B.; Duarte, P.M.; Faveri, M.; Figueiredo, L.C.; Feres, M. Do patients with aggressive and chronic periodontitis exhibit specific differences in the subgingival microbial composition? A systematic review. *J. Periodontol.* **2020**, *91*, 1520. [[CrossRef](#)]
13. Herrera, D.; Contreras, A.; Gamonal, J.; Oteo, A.; Jaramillo, A.; Silva, N.; Sanz, M.; Botero, J.E.; Leon, R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 106–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Albandar, J.M. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent. Clin. N. Am.* **2005**, *49*, 517–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Feres, M.; Teles, F.; Teles, R.; Figueiredo, L.C.; Faveri, M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontol. 2000* **2016**, *72*, 30–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Botero, J.E.; Contreras, A.; Lafaurie, G.; Jaramillo, A.; Betancourt, M.; Arce, R.M. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 696–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Contreras, A.; Moreno, S.M.; Jaramillo, A.; Pelaez, M.; Duque, A.; Botero, J.E.; Slots, J. Periodontal microbiology in Latin America. *Periodontol. 2000* **2015**, *67*, 58–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mínguez, M.; Pousa, X.; Herrera, D.; Blasi, A.; Sanchez, M.C.; Leon, R.; Sanz, M. Characterization and serotype distribution of Aggregatibacter actinomycetemcomitans isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Arch. Oral Biol.* **2014**, *59*, 1359–1367. [[CrossRef](#)]
19. Sanz, M.; van Winkelhoff, A.J.; Herrera, D.; Delleimijn-Kippuw, N.; Simon, R.; Winkel, E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur. J. Oral Sci.* **2000**, *108*, 383–392. [[CrossRef](#)]
20. Donachie, S.P.; Foster, J.S.; Brown, M.V. Culture clash: Challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J.* **2007**, *1*, 97–99. [[CrossRef](#)]
21. Tomšič, K.; Rodič, K.; Sotošek, A.; Videmšek, P.; Seme, K.; Herrera, D.; Sanz, M.; Gašperšič, R. Do Differences in Cultivable Subgingival Species Exist between Different Periodontitis Stages and Grades? *Oral Health Prev. Dent.* **2021**, *19*, 15–24. [[CrossRef](#)]
22. Tanner, A.C. Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. *J. Oral Biosci.* **2015**, *57*, 18–26. [[CrossRef](#)]
23. Tonetti, M.S.; Greenwell, H.; Kornman, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45* (Suppl. 20), S149–S161. [[CrossRef](#)]
24. Von Elm, E.; Altman, D.G.; Egger, M.; Pocock, S.J.; Gøtzsche, P.C.; Vandenbroucke, J.P.; Initiative, S. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Int. J. Surg.* **2014**, *12*, 1495–1499. [[CrossRef](#)]

25. Chapple, I.L.C.; Mealey, B.L.; Van Dyke, T.E.; Bartold, P.M.; Domisch, H.; Eickholz, P.; Geisinger, M.L.; Genco, R.J.; Glogauer, M.; Goldstein, M.; et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45* (Suppl. 20), S68–S77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Badersten, A.; Nilveus, R.; Egelberg, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. *J. Clin. Periodontol.* **1985**, *12*, 432–440. [[CrossRef](#)]
27. O’Leary, T.J.; Drake, R.B.; Naylor, J.E. The plaque control record. *J. Periodontol.* **1972**, *43*, 38. [[CrossRef](#)]
28. Syed, S.A.; Loesche, W.J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl. Microbiol.* **1972**, *24*, 638–644. [[CrossRef](#)]
29. Alsina, M.; Olle, E.; Frias, J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 509–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Van Winkelhoff, A.J.; Loos, B.G.; van der Reijden, W.A.; van der Velden, U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.* **2002**, *29*, 1023–1028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. IV Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV) 2014. Available online: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf> (accessed on 28 August 2021).
32. Eke, P.I.; Wei, L.; Thornton-Evans, G.O.; Borrell, L.N.; Borgnakke, W.S.; Dye, B.; Genco, R.J. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. *J. Periodontol.* **2016**, *87*, 1174–1185. [[CrossRef](#)]
33. van Winkelhoff, A.J.; Bosch-Tijhof, C.J.; Winkel, E.G.; van der Reijden, W.A. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J. Periodontol.* **2001**, *72*, 666–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Loos, B.G.; John, R.P.; Laine, M.L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, *32* (Suppl. 6), 159–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rams, T.E.; Feik, D.; Listgarten, M.A.; Slots, J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **1992**, *7*, 1–6. [[CrossRef](#)]
36. Kremer, B.H.; Loos, B.G.; van der Velden, U.; van Winkelhoff, A.J.; Craandijk, J.; Bulthuis, H.M.; Hutter, J.; Varoufaki, A.S.; van Steenberg, T.J. *Peptostreptococcus micros* smooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *J. Periodontol.* **2000**, *71*, 209–218. [[CrossRef](#)]
37. Van Dalen, P.J.; van Winkelhoff, A.J.; van Steenberg, T.J. Prevalence of *Peptostreptococcus micros* morphotypes in patients with adult periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **1998**, *13*, 62–64. [[CrossRef](#)]
38. Hajishengallis, G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol. Oral Microbiol.* **2014**, *29*, 248–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hajishengallis, G.; Diaz, P.I. *Porphyromonas gingivalis*: Immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis. *Curr. Oral Health Rep.* **2020**, *7*, 12–21. [[CrossRef](#)]
40. Lamont, R.J.; Koo, H.; Hajishengallis, G. The oral microbiota: Dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 745–759. [[CrossRef](#)]
41. Lafaurie, G.I.; Contreras, A.; Baron, A.; Botero, J.; Mayorga-Fayad, I.; Jaramillo, A.; Giraldo, A.; Gonzalez, F.; Mantilla, S.; Botero, A.; et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: A multicenter study. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 629–639. [[CrossRef](#)]
42. Mayorga-Fayad, I.; Lafaurie, G.I.; Contreras, A.; Castillo, D.M.; Baron, A.; Aya Mdel, R. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogota, Colombia: An epidemiological approach. *Biomedica* **2007**, *27*, 21–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Van Winkelhoff, A.J.; Rurenga, P.; Wekema-Mulder, G.J.; Singadji, Z.M.; Rams, T.E. Non-oral gram-negative facultative rods in chronic periodontitis microbiota. *Microb. Pathog.* **2016**, *94*, 117–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vartoukian, S.R.; Moazzez, R.V.; Paster, B.J.; Dewhirst, F.E.; Wade, W.G. First cultivation of health-associated *Tannerella* sp. HOT-286 (BU063). *J. Dent. Res.* **2016**, *95*, 1308–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Material Suplementario.

Table S1. Distribution of periodontitis grades by country.

	First comparison	Spain		Colombia		Second comparison (between countries ^a)	
		n	%	n	%	p value	p value
Grade	A	8	13.3	7	11.9	1.000	1.000
	B	24	40.0	26	44.1		
	C	28	46.7	26	44.1		

n, number of patients; %, percentage. ^a Chi-square test with Bonferroni correction.

Periodontitis grades:

Indirect estimation was made using bone loss as a function of age at the most affected tooth or case presentation (radiographic bone loss (RBL) expressed as percentage of root length divided by the age of the subject, RBL/age):

- Periodontitis in grade A. Percentage of RBL / age <0.25, non-smoker.
- Periodontitis in grade B. Percentage of RBL / age 0.25 to 1.0, smoker <10 cigarettes/day.
- Periodontitis in grade C. Percentage of RBL / age >1.0, smoker ≥10 cigarettes/day.

Table S2. Clinical characteristics of the selected sites for subgingival sampling.

		Health and Gingivitis			Periodontitis I-II			Periodontitis III-IV		
		n	Mean (SD)	<i>p</i> value ^a	n	Mean (SD)	<i>p</i> value ^a	n	Mean (SD)	<i>p</i> value ^a
PD (mm)	Spain	30	2.79 (0.39)	0.271	30	4.43 (0.69)	0.203	30	6.10 (1.29)	0.280
	Colombia	18	2.66 (0.33)		23	4.71 (0.91)		36	5.79 (1.01)	
CAL (mm)	Spain	30	0	1.000	30	4.09 (0.31)	0.411	30	6.47 (1.31)	0.824
	Colombia	18	0		23	3.92 (1.05)		36	6.39 (1.52)	
BoP (%)	Spain	30	36.66 (40.86)	0.060	30	87.50 (21.52)	0.111	30	95.00 (13.77)	0.158
	Colombia	18	15.27 (29.87)		23	95.65 (12.27)		36	98.61 (5.80)	
PII (%)	Spain	30	55.00 (32.43)	<0.001	30	80.00 (28.16)	0.126	30	93.33 (15.99)	0.070
	Colombia	18	9.72 (22.91)		23	91.30 (23.36)		36	98.61 (5.80)	

Probing depth (PD); clinical attachment level (CAL); bleeding on probing (BoP); plaque index (PII). SD, standard deviation; n, number of patients.

^a Student t test.

Table S3. Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species according to country, in periodontitis in stages I-II patients. Counts and proportions were calculated considering all samples.

Periodontitis I-II											
	Country	Counts ^a				Proportions ^a				Frequency ^b	
		n	Mean (SD)	Median (IR)	p value	n	Mean (SD)	Median (IR)	p value	n (%)	p value
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Spain	30	5.07 (1.20)	5.05 (0.92)	0.161	30	13.89 (18.78)	7.27 (14.33)	0.068	29 (96.7)	<0.001
	Colombia	23	2.95 (3.22)	0.00 (6.26)		23	15.45 (23.32)	0.00 (36.00)		11 (47.8)	
<i>Prevotella intermedia</i>	Spain	30	4.15 (1.41)	4.32 (1.57)	0.238	30	2.32 (4.16)	0.82 (2.34)	0.189	28 (93.3)	0.014
	Colombia	23	3.70 (2.79)	5.30 (5.78)		23	8.43 (11.19)	5.06 (12.50)		15 (65.2)	
<i>Tannerella forsythia</i>	Spain	30	1.39 (2.18)	0.00 (4.30)	0.184	30	0.39 (0.79)	0.00 (0.67)	0.251	9 (30.0)	0.487
	Colombia	23	2.15 (2.76)	0.00 (5.26)		23	1.54 (2.58)	0.00 (2.86)		9 (39.1)	
<i>Parvimonas micra</i>	Spain	30	0.32 (1.22)	0.00 (0.00)	0.001	30	0.49 (2.64)	0.00 (0.00)	0.002	2 (6.7)	0.002
	Colombia	23	2.32 (2.73)	0.00 (5.30)		23	2.96 (5.23)	0.00 (4.69)		10 (43.5)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Spain	30	4.21 (1.75)	4.69 (0.98)	0.008	30	2.52 (2.86)	1.99 (3.02)	0.004	26 (86.7)	0.687
	Colombia	23	4.94 (1.68)	5.34 (1.12)		23	7.46 (6.85)	6.69 (9.70)		21 (91.3)	
<i>Campylobacter rectus</i>	Spain	30	0.35 (1.36)	0.00 (0.00)	0.211	30	0.94 (4.54)	0.00 (0.00)	0.211	2 (6.7)	0.499
	Colombia	23	0	0		23	0	0		0 (0.0)	
<i>Eikenella corrodens</i>	Spain	30	0.66 (1.51)	0.00 (0.00)	0.042	30	0.14 (0.48)	0.00 (0.00)	0.042	5 (16.7)	0.061
	Colombia	23	0	0		23	0	0		0 (0.0)	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Spain	30	0.78 (1.80)	0.00 (0.00)	<0.001	30	0.13 (0.36)	0.00 (0.00)	<0.001	5 (16.7)	<0.001
	Colombia	23	4.85 (2.02)	5.47 (1.30)		23	11.21 (15.02)	6.12 (11.97)		20 (87.0)	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Spain	30	0	0	<0.001	30	0	0	<0.001	0 (0.0)	<0.001
	Colombia	23	4.94 (2.07)	5.63 (1.34)		23	13.42 (11.32)	13.86 (16.80)		20 (87.0)	

n, number of patients; n (%), number and percentage of positive samples. ^a, Mann-Whitney test. ^b, Chi-square test.

Table S4. Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species according to country, in periodontitis in stages III-IV patients. Counts and proportions were calculated considering all samples.

Periodontitis III-IV											
	Country	Counts ^a				Proportions ^a				Frequency ^b	
		n	Mean (SD)	Median (IR)	<i>p</i> value	n	Mean (SD)	Median (IR)	<i>p</i> value	n (%)	<i>p</i> value
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Spain	30	5.34 (1.94)	5.97 (1.34)	<0.001	30	18.27 (17.98)	13.72 (25.91)	<0.001	27 (90.0)	<0.001
	Colombia	36	1.74 (2.69)	0.00 (5.00)		36	3.63 (7.38)	0.00 (3.70)		11 (30.6)	
<i>Prevotella intermedia</i>	Spain	30	4.27 (2.09)	5.00 (1.99)	0.736	30	5.09 (8.45)	1.65 (3.84)	0.263	25 (83.3)	0.410
	Colombia	36	4.09 (2.48)	5.20 (4.83)		36	8.87 (11.36)	3.53 (13.90)		27 (75.0)	
<i>Tannerella forsythia</i>	Spain	30	2.11 (2.48)	0.00 (4.68)	0.515	30	0.80 (1.73)	0.00 (0.89)	0.638	13 (43.3)	0.283
	Colombia	36	1.60 (2.47)	0.00 (4.94)		36	0.94 (1.81)	0.00 (1.21)		11 (30.6)	
<i>Parvimonas micra</i>	Spain	30	0.48 (1.48)	0.00 (0.00)	0.885	30	0.09 (0.37)	0.00 (0.00)	0.772	3 (10.0)	1.000
	Colombia	36	0.56 (1.63)	0.00 (0.00)		36	0.97 (3.39)	0.00 (0.00)		4 (11.1)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Spain	30	4.25 (1.69)	4.77 (1.00)	0.012	30	1.68 (1.63)	0.99 (2.30)	<0.001	27 (90.0)	0.719
	Colombia	36	4.79 (2.07)	5.42 (1.29)		36	13.72 (16.47)	8.76 (21.59)		31 (86.1)	
<i>Campylobacter rectus</i>	Spain	30	0.45 (1.37)	0.00 (0.00)	0.054	30	0.17 (0.54)	0.00 (0.00)	0.054	3 (10.0)	0.089
	Colombia	36	0	0		36	0	0		0 (0.0)	
<i>Eikenella corrodens</i>	Spain	30	0.68 (1.79)	0.00 (0.00)	0.296	30	0.35 (1.18)	0.00 (0.00)	0.326	4 (13.3)	0.399
	Colombia	36	0.30 (1.27)	0.00 (0.00)		36	0.53 (2.28)	0.00 (0.00)		2 (5.6)	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Spain	30	1.02 (1.90)	0.00 (0.90)	<0.001	30	0.10 (0.20)	0.00 (0.05)	<0.001	7 (23.3)	0.001
	Colombia	36	3.39 (2.65)	5.00 (5.42)		36	7.51 (14.42)	1.71 (8.54)		23 (63.9)	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Spain	30	0	0	<0.001	30	0	0	<0.001	0 (0.0)	<0.001
	Colombia	36	5.31 (1.52)	5.60 (1.52)		36	19.23 (20.17)	11.40 (26.99)		34 (94.4)	

n, number of patients; n (%), number and percentage of positive samples. ^a, Mann-Whitney test. ^b, Chi-square test.

Table S5. Mean and standard deviation (SD) and median and interquartile range (IR) of counts (log transformed), proportions and frequencies of detection of target bacterial species, according to country, in health and gingivitis subjects. Counts and proportions were calculated considering all samples.

Health and Gingivitis											
	Country	Counts ^a				Proportions ^a				Frequency ^b	
		n	Mean (SD)	Median (IR)	<i>p</i> value	n	Mean (SD)	Median (IR)	<i>p</i> value	n (%)	<i>p</i> value
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Spain	30	2.62 (2.61)	3.29 (5.42)	0.444	30	7.67 (14.42)	0.43 (10.28)	0.178	16 (53.3)	0.178
	Colombia	18	1.88 (2.76)	0.00 (5.63)		18	2.90 (6.56)	0.00 (2.28)		6 (33.3)	
<i>Prevotella intermedia</i>	Spain	30	2.26 (2.24)	2.23 (4.00)	<0.001	30	2.05 (5.55)	0.03 (0.72)	<0.001	17 (56.7)	0.001
	Colombia	18	5.68 (0.81)	5.77 (1.18)		18	11.47 (9.64)	7.61 (12.89)		18 (100.0)	
<i>Tannerella forsythia</i>	Spain	30	0.72 (1.65)	0.00 (0.00)	<0.001	30	0.52 (2.12)	0.00 (0.00)	<0.001	5 (16.7)	<0.001
	Colombia	18	5.03 (1.92)	5.77 (0.88)		18	9.38 (8.94)	6.75 (12.74)		16 (88.9)	
<i>Parvimonas micra</i>	Spain	30	0.45 (1.41)	0.00 (0.00)	<0.001	30	0.24 (0.79)	0.00 (0.00)	<0.001	3 (10.0)	<0.001
	Colombia	18	3.97 (2.59)	5.26 (5.79)		18	5.84 (9.33)	3.35 (5.89)		13 (72.2)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Spain	30	4.03 (1.29)	4.25 (1.03)	<0.001	30	3.54 (3.63)	2.39 (3.40)	0.443	28 (93.3)	0.521
	Colombia	18	5.23 (0.65)	5.25 (0.91)		18	3.78 (2.99)	2.73 (5.05)		18 (100)	
<i>Campylobacter rectus</i>	Spain	30	0.37 (1.14)	0.00 (0.00)	0.171	30	0.29 (1.11)	0.00 (0.00)	0.171	3 (10.0)	0.282
	Colombia	18	0	0		18	0	0		0 (0.0)	
<i>Eikenella corrodens</i>	Spain	30	0.64 (1.31)	0.00 (0.00)	0.134	30	0.08 (0.23)	0.00 (0.00)	0.138	6 (20.0)	0.325
	Colombia	18	1.69 (2.49)	0.00 (4.68)		18	0.80 (1.37)	0.00 (1.51)		6 (33.3)	
<i>Capnocytophaga spp.</i>	Spain	30	0.42 (1.28)	0.00 (0.00)	<0.001	30	0.23 (1.02)	0.00 (0.00)	<0.001	3 (10.0)	<0.001
	Colombia	18	5.59 (0.49)	5.59 (0.78)		18	8.42 (8.00)	5.06 (7.39)		18 (100.0)	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Spain	30	0	0	<0.001	30	0	0	<0.001	0 (0.00)	<0.001
	Colombia	18	5.97 (0.60)	5.99 (0.95)		18	18.54 (10.23)	21.21 (15.54)		18 (100.0)	

n, number of patients; n (%), number and percentage of positive samples. ^a Mann-Whitney test. ^b Chi-square test.

