



Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**



---

---

---

# Universidad Nacional Autónoma de México

## Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Análisis del microbioma oral de pacientes diabéticos y no diabéticos con enfermedad periodontal

### TESIS

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**Fernando Vallejo Lecuona**

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Clara Estela Díaz Velásquez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<b>Abreviaturas</b>	<b>0</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. <i>El periodonto</i>	1
1.1.1. La encía	1
1.1.2. El ligamento periodontal	3
1.1.3. El cemento radicular	4
1.1.4. El hueso alveolar	5
1.2. <i>La enfermedad periodontal o periodontitis</i>	6
1.3. <i>Microbiología bucal y microbioma oral</i>	8
1.4. <i>Diabetes Mellitus</i>	9
1.4.1. Diabetes Mellitus tipo 1	11
1.4.2. Diabetes Mellitus tipo 2	12
1.4.3. Epidemiología de la Diabetes	14
1.5. <i>Interrelaciones entre la diabetes Mellitus y la periodontitis</i>	17
1.5.1. Factores biológicos de pacientes diabéticos que tienen un efecto en la periodontitis	17
1.5.2. Efecto y rol de la periodontitis en el control metabólico de la diabetes	20
1.5.3. Respuesta sistémica en la diabetes por el tratamiento de la periodontitis	21
1.6. <i>El microbioma y su estudio</i>	23
<b>2. Justificación</b>	<b>25</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>26</b>
3.1. <i>Objetivo General</i>	26
3.2. <i>Objetivos Particulares</i>	26
<b>4. Hipótesis</b>	<b>27</b>
<b>5. Material y Métodos</b>	<b>28</b>
5.1. <i>Toma de muestra y criterios</i>	28
5.2. <i>Extracción de DNA genómico (gDNA)</i>	28
5.3. <i>Verificación de la calidad del gDNA</i>	28
5.4. <i>Amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA</i>	29
5.5. <i>Indización de bibliotecas</i>	30
5.6. <i>Normalización de bibliotecas para secuenciación</i>	30
5.7. <i>Secuenciación</i>	30
5.8. <i>Análisis Bioinformático</i>	30
<b>6. Resultados</b>	<b>32</b>
6.1. <i>Muestras y descripción de la población</i>	32
6.2. <i>Extracción y evaluación de la calidad del gDNA</i>	33

6.3.	<i>Amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA y preparación de bibliotecas genómicas</i>	34
6.4.	<i>Secuenciación</i>	36
6.5.	<i>Análisis bioinformático: control de calidad</i>	36
6.6.	<i>Análisis bioinformático (Parámetros ecológicos)</i>	38
<b>7.</b>	<b>Discusión</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusión</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>55</b>
<b>10.</b>	<b>Referencias</b>	<b>56</b>
<b>11.</b>	<b>Anexos</b>	<b>65</b>
	<i>Anexo 1</i>	65
	<i>Anexo 2</i>	66
	<i>Anexo 3</i>	72
	<i>Anexo 4</i>	89
	<i>Anexo 5</i>	92
	<i>Anexo 6</i>	99

## *Abreviaturas*

aa: Aminoácidos

bp: pares de bases

Ctrl: Controles

Da: Daltons (Unidad de medida molecular)

Diab: Diabéticos

dL: decilitros

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsDNA: Ácido desoxirribonucleico de doble cadena

gDNA: Ácido desoxirribonucleico genómico

HMP: Human Microbiome Project (Proyecto del Microbioma Humano)

IMC: Índice de masa corporal

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

L: Litros

min: minutos

µL: microlitros

mL: mililitros

mg: miligramos

mmol: milimoles

mm: milímetros

mM: milimolar

ng: nanogramos

nM: nanomolar

NIH: National Institute of Health (Instituto Nacional de Salud de EE.UU.)

OTU: Unidad Taxonómica Operativa

PCA: Análisis de componentes principales

PCoA: Análisis de coordenadas principales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pM: picomolar

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

S: Svedberg (unidades del coeficiente de sedimentación de macromoléculas)

s: segundos

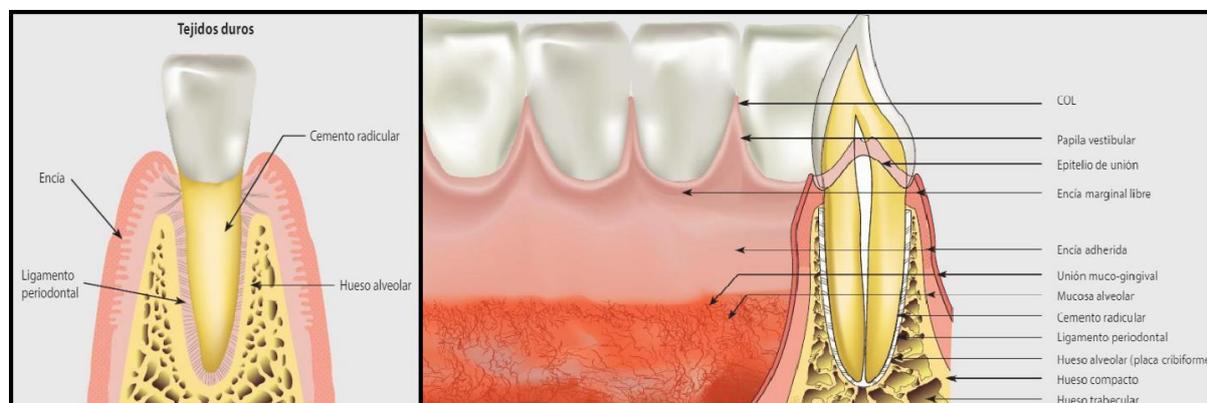
WGS: Whole Genome Sequencing (Secuenciación de genoma completo)

x g: fuerzas de gravedad (unidad para centrifugación)

## 1. Introducción

### 1.1. El periodonto

La cavidad oral se encuentra compuesta por diferentes conjuntos tisulares, entre los que destacan las piezas dentales y los tejidos conectivos que las anclan a los huesos maxilares; este conjunto de tejidos se denomina **periodonto**, el cual está compuesto por cuatro tejidos: 1) encía, 2) ligamento periodontal, 3) cemento radicular y 4) hueso alveolar (Figura 1.1). El primero de ellos corresponde al *periodonto de protección* y los tres restantes componen el *periodonto de inserción* (Vargas *et al.*, 2016).



**Figura 1.1.-** A) Los cuatro componentes del periodonto y el orden entre ellos. B) Componentes del periodonto, además de su ubicación anatómica en la boca. (Vargas *et al.*, 2016)

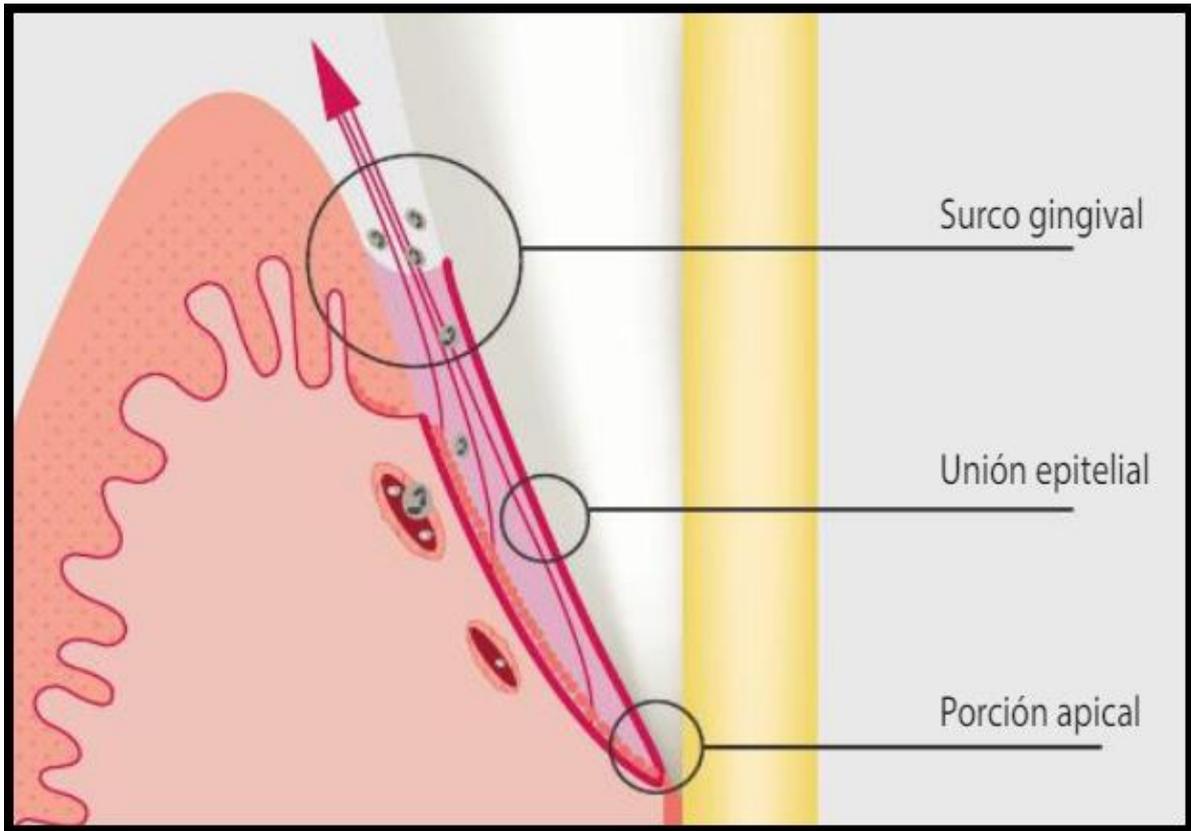
El periodonto tiene como principal función la protección y sujeción de las piezas dentales, es por esto que está sometido a variaciones funcionales y morfológicas que cambian con el paso del tiempo (Newman *et al.*, 2004). Es importante mencionar que dentro de las funciones de protección se incluyen las fuerzas generadas durante la masticación y el habla, así como el mantenimiento de la integridad de la superficie, la adaptación a los cambios estructurales asociados a la edad y el uso a través de la regeneración continua del tejido; y finalmente, la característica más importante concerniente a esta tesis, la defensa contra influencias nocivas del medio que estén presentes en la boca (Vargas *et al.*, 2016).

#### 1.1.1. La encía

Del exterior al interior, el primer tejido que se encuentra en la boca es la encía, que junto con el revestimiento del paladar duro componen la mucosa masticatoria. La encía se extiende desde el borde marginal hasta la línea mucogingival (Figura 1.1), puede ser dividida de acuerdo a la posición y características morfológicas e histológicas que presenta en:



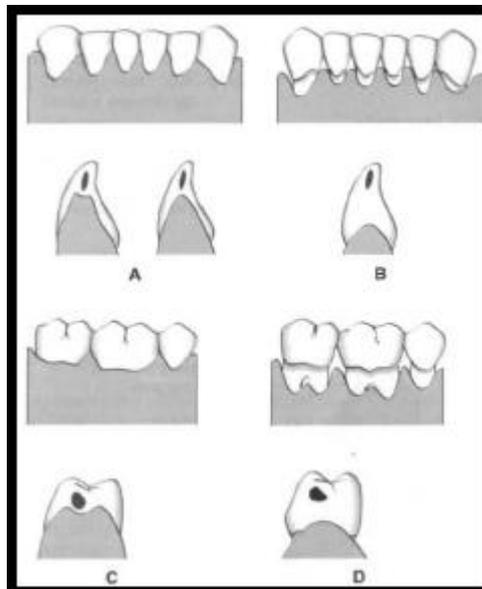
**Encía libre o marginal:** Comprende a la porción terminal o el borde de la encía, rodeando a modo de collar los dientes, que al no unirse con ellos forma el surco gingival. El surco gingival tiene forma de “V” y usualmente mide entre 0.5 y 3 mm. La medida de la profundidad es de importancia clínica pues está asociada a algunas patologías; además en él existe la presencia de un fluido que se filtra desde el tejido subepitelial, denominado fluido crevicular gingival (Figura 1.2). El fluido crevicular gingival proviene del plexo sanguíneo y contiene principalmente un conjunto de proteínas séricas, prostaglandinas, citocinas, células descamadas, neutrófilos y otros componentes del sistema inmunológico. Este fluido participa en el mantenimiento de la estructura y la defensa microbiana de la zona. En la parte inferior de la encía libre, en ocasiones es apreciable el surco marginal, el cual delimita su unión con la encía insertada (Newman *et al.*, 2004 & Vargas *et al.*, 2016).



**Figura 1.2.-** Surco gingival, características y representación de la excreción de fluido crevicular gingival conteniendo células polimorfonucleares.

□

Encía interdental o papila: Forma parte de la encía marginal y se encuentra en las regiones interdentes justo por debajo de la zona de contacto dental, por lo general tiene forma piramidal. En la zona anterior la papila termina de forma puntiaguda, mientras que en la zona de los premolares y molares presenta una concavidad denominada “col”, lo que forma una papila vestibular y otra lingual o palatina. La forma de esta encía está determinada por la zona de contacto dental y la presencia o ausencia de cierto grado de recesión (Figura 1.3; Newman *et al.*, 2004 & Vargas *et al.*, 2016).



**Figura 1.3.-** Comparación anatómica de la encía interdental sana (izquierda) y después de una recesión gingival (derecha); A) Segmento mandibular anterior, vista vestibular (arriba) y vestibulolingual (abajo) sanas; B) Segmento mandibular anterior, vistas vestibular (arriba) y vestibulolingual (abajo) post recesión; C) Región mandibular posterior, vistas vestibular (arriba) y vestibulolingual (abajo) sanas; D) Región mandibular posterior, vistas vestibular (arriba) y vestibulolingual (abajo) post recesión. En negro se marcan las zonas de contacto de los dientes.

□

Encía insertada: Es un tejido firme, resiliente y está fijado al hueso alveolar directamente. Tiene una longitud de 4 a 6 mm en la zona de los incisivos, pero varía entre personas. En la zona lingual de la mandíbula termina en la unión de la mucosa lingual, mientras que en el maxilar se une a la mucosa palatina de forma invisible. En la zona vestibular, la encía se une hasta la mucosa alveolar. El cambio en el ancho de esta encía es producto de modificaciones de la posición de su extremo coronario (Newman *et al.*, 2004 & Vargas *et al.*, 2016).

### 1.1.2. El ligamento periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo, especializado, muy fibroso, vascularizado, y altamente celular, el cual rodea las raíces de los dientes y conecta con el hueso. Consiste de una matriz extracelular compuesta de fibras, fluido fundamental y células relacionadas con la formación de los tejidos periodontales, así como una gran cantidad de vasos sanguíneos y nervios (Vargas *et al.*, 2016).

Las fibras que componen al ligamento periodontal están formadas principalmente de colágeno I y III. Estas fibras se disponen en haces que siguen una trayectoria sinuosa agrupadas formando una red de fibras. Las regiones terminales de las fibras principales se denominan fibras de *Sharpey* y se insertan en el cemento y el hueso alveolar (Newman *et al.*, 2004). Existen 5 tipos principales de grupos de fibras (Figura 1.4):

□

De la cresta alveolar: Se insertan desde el cemento, en sentido oblicuo justo por debajo de las fibras gingivales, hasta la cresta alveolar, evitan la extrusión dental, impidiendo los movimientos laterales; su incisión no incrementa de manera relevante el movimiento dental.

□

Horizontales: Se extienden de manera perpendicular al eje del diente, desde el cemento hasta el hueso, y se encuentran justo debajo de la cresta alveolar.

□

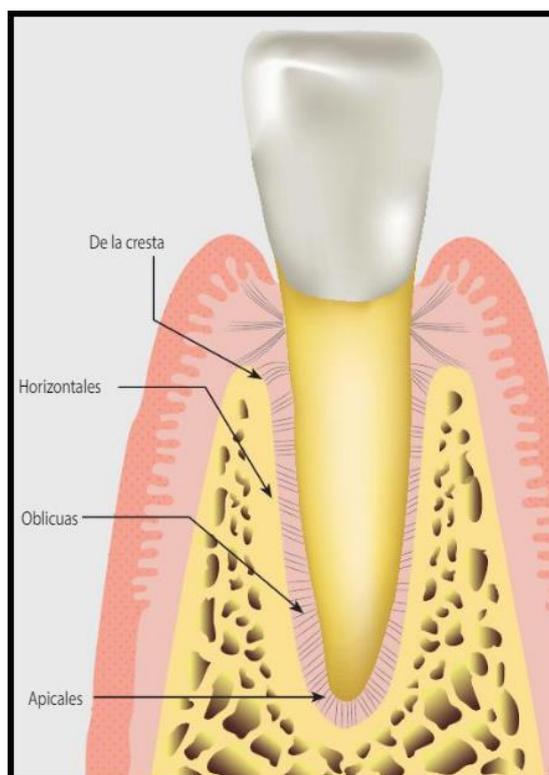
Oblicuas: Son las más numerosas, corren desde el cemento hasta insertarse en el hueso de manera coronal oblicua. Sostienen la mayor parte de la tensión masticatoria vertical.

□

Apicales: Estas fibras divergen de manera irregular desde el cemento alrededor del ápice radicular hasta el hueso en el fondo del alveolo.

□

Interradiculares: Se abren en abanico desde el cemento hasta el hueso en la zona interradicular, y forman la cresta del septum interradicular de los dientes multirradiculares (Newman *et al.*, 2004).



**Figura 1.4.-** Fibras que componen al ligamento periodontal.

El ligamento periodontal es un tejido multifuncional debido a sus diversas características estructurales y tipos celulares. Las diversas funciones que realiza son:



**Física:** El ligamento periodontal mantiene los dientes dentro de los alvéolos, al tiempo que soporta las fuerzas de la masticación, absorbiendo su impacto de distintas maneras. Las fuerzas ligeras son soportadas por el fluido intravascular al ser forzado fuera de los vasos sanguíneos. Las fuerzas moderadas son amortiguadas por el fluido extravascular que es sacado del espacio del ligamento hacia los espacios medulares adyacentes; finalmente las fuerzas más intensas son absorbidas por las fibras principales del ligamento. Además, el ligamento determina la movilidad y migración de los dientes dentro de los alvéolos.



**Sensorial:** El ligamento actúa como receptor de la posición de los maxilares durante la masticación. Así mismo, posee nervios mielinizados desde el alveolo que inervan la pulpa y el ligamento.



**Formativa y nutritiva:** El ligamento participa en la formación, remodelación y regeneración de los tejidos periodontales, ya que posee células que son capaces de formar o reabsorber los tejidos del cemento, hueso y del propio ligamento. También se encarga de mantener la vitalidad de sus diversos componentes celulares por medio de su vascularización (Vargas *et al.*, 2016).

### **1.1.3. El cemento radicular**

Es el tejido mesenquimatoso mineralizado que cubre la dentina de la raíz del diente. Sirve para anclarlos al hueso por medio del ligamento periodontal, debido a que en el cemento se insertan las fibras de Sharpey. Sus principales funciones son; propiciar el anclaje de los dientes al hueso alveolar por la inserción de fibras de colágeno, sirve como una capa protectora de la dentina, mantiene la integridad de la raíz debido a que es un tejido mineralizado altamente sensible, ayuda a mantener el diente en su posición funcional a lo largo de la vida, y participa en la reparación y reabsorción periodontal. Estas

funciones se ven alteradas por la enfermedad periodontal o la exposición al medio externo (Vargas *et al.*, 2016).

El cemento es de color amarillento con terminado mate, y su permeabilidad varía con la edad y el tipo de cemento; los tipos principales de cemento son:



*El cemento acelular*: Es el primero en formarse y cubre desde el tercio cervical hasta la mitad de la raíz, como su nombre lo indica no contiene células; se forma antes que el diente alcance el plano oclusivo. Su estructura está constituida principalmente por fibras de Sharpey, ya que su función principal es el soporte dentario; además contiene fibrillas de colágeno intrínsecas calcificadas y dispuestas irregularmente o paralelas a la superficie.



*El cemento celular*: Se forma una vez que el diente llega al plano oclusivo, es más irregular y contiene células en espacios individuales que se comunican entre sí a través de un sistema de canalículos conectados; es menos calcificado y las fibras de Sharpey ocupan una menor porción y están rodeadas de otras fibras desordenadas o paralelas a la superficie de la raíz. Además las fibras de Sharpey pueden o no estar calcificadas por completo (Newman *et al.*, 2004).

Ambos tipos de cemento están conformados por laminillas separadas por líneas aumentativas paralelas a la raíz, las cuales representan los períodos de reposo de la formación y se encuentran más mineralizadas que el cemento adyacente (Newman *et al.*, 2004).

#### **1.1.4. El hueso alveolar**

Es la parte de la mandíbula y maxila que forma y sostiene los alvéolos dentarios, se forma cuando el diente erupciona con el fin de proveer la inserción ósea para el ligamento periodontal y se reabsorbe gradualmente cuando el diente se pierde. Radiográficamente el hueso alveolar es compacto y se observa una lámina radiopaca que rodea la raíz del diente que se denomina lámina dura.

Su formación ocurre por las células del folículo dental junto con el cemento y el ligamento periodontal, presenta una numerosa cantidad de perforaciones por las que pasan vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas hacia el ligamento periodontal. El hueso alveolar está constantemente en remodelación debido a que debe responder y resistir las fuerzas de masticación, esta remodelación es similar a la del hueso en general, sin embargo es asincrónica, por lo cual la unión a las fibras del ligamento se pierde únicamente de manera focal y por poco tiempo. Las fibras de Sharpey se insertan en este hueso, éstas se encuentran hipermineralizadas en sus extremos e hipomineralizadas en su núcleo. Por lo general tienen un mayor diámetro pero están en menor número que las que se encuentran en el cemento, además de que el colágeno de estas fibras es menos maduro que en sus contrapartes del cemento (Vargas *et al.*, 2016).

Está conformada por varias capas de fibras intrínsecas más o menos paralelas al alveolo, estas fibras componen el 95% de su parte orgánica y están formadas principalmente por colágeno I y III, por otra parte el otro 5% del componente orgánico es no fibrilar. El componente inorgánico está dado principalmente por cristales de hidroxipatita (Vargas *et al.*, 2016).

## 1.2. La enfermedad periodontal o periodontitis

Las enfermedades periodontales son un amplio espectro de patologías que afectan los tejidos de soporte del diente. En la presente tesis nos enfocaremos principalmente en la periodontitis, que es una enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales ocasionada por la presencia de microorganismos específicos (Kinane *et al.*, 2017). La acumulación de microorganismos en la placa dentobacteriana a lo largo del margen gingival produce inicialmente gingivitis, que es el enrojecimiento, inflamación y sangrado de la encía; pero si no es tratada puede conllevar hasta la pérdida de la pieza dentaria y la reabsorción del hueso alveolar (Herrera *et al.*, 2018).

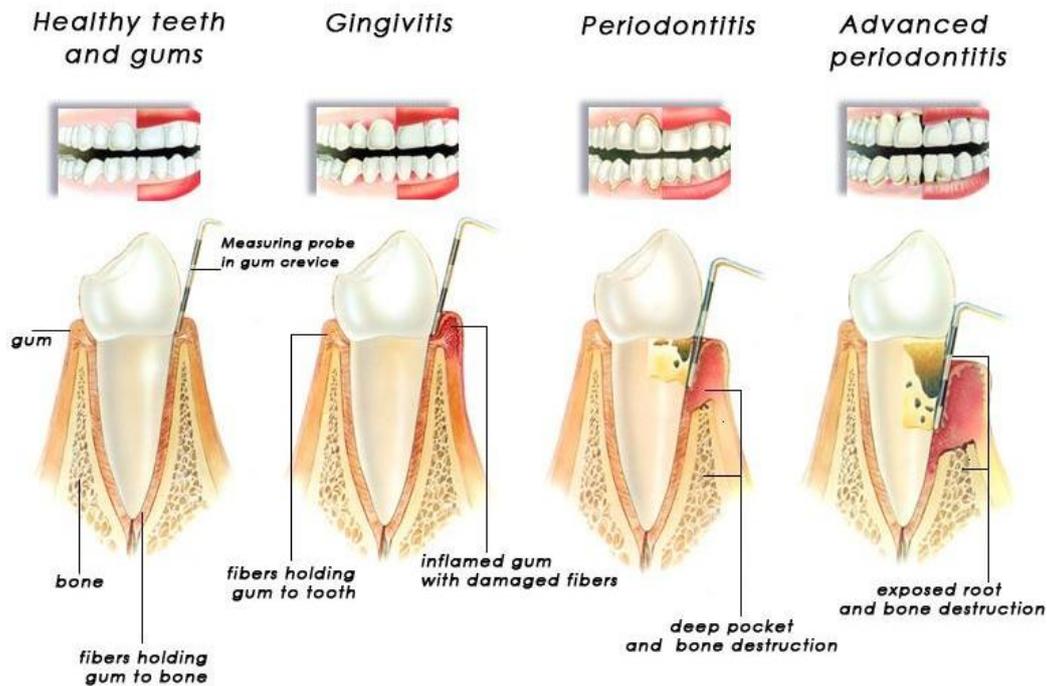
La periodontitis se puede dividir en dos tipos principales, la periodontitis crónica y la agresiva (Papapanou *et al.*, 2018). Aunque en 2017 se reportó que no hay evidencia para separar la enfermedad en dos tipos distintos, la mayoría de artículos aún manejan esta división y para términos prácticos se explicarán de manera breve en qué consisten. Existen otros tipos como las producidas por enfermedades sistémicas, las causadas por un microorganismo en específico y las ocasionadas por daños físicos o necrotizantes (Tonetti *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2016).

□

Periodontitis agresiva: Usualmente se desarrolla en etapas tempranas de la vida. La hipótesis más aceptada es el papel que desempeñan los factores sistémicos, el principal causante de esta enfermedad. Algunas personas la presentan en episodios pronunciados de destrucción de los tejidos, caracterizados por una rápida pérdida de la inserción y destrucción ósea (Vargas *et al.*, 2016).

□

Periodontitis crónica: Es el tipo más frecuente de periodontitis, el cual se desarrolla debido a la progresión de la gingivitis no tratada, puede llegar a la pérdida de tejidos periodontales creando sacos periodontales y pudiendo conllevar a la pérdida de los dientes (Kinane *et al.*, 2017). Es sitio específica y producida por un diverso grupo de microorganismos específicos, algunos de los cuales son considerados nativos de la cavidad oral. La progresión de esta enfermedad está ligada a la efectividad de la salud bucal, sin embargo, otros factores como la susceptibilidad genética, condiciones sistémicas como la diabetes, o hábitos como el tabaquismo desempeñan un papel importante durante su desarrollo. Se considera generalizada si más de 10 dientes presentan signos de pérdida periodontal, o local si involucra una cantidad menor, y su severidad está condicionada con base en la pérdida de inserción de los dientes (Figura 1.5) como; leve si la pérdida es menor de 2 mm, moderada si se encuentra entre 2 y 5 mm o grave si es mayor de 5 mm (Vargas *et al.*, 2016).



**Figura 1.5.-** Categorías de severidad de la periodontitis, se aprecia la retracción del margen gingival y la pérdida de tejidos conforme aumenta el desarrollo de la periodontitis.

Los signos más comunes del desarrollo de periodontitis son el enrojecimiento y sangrado de las encías causado por los factores y respuestas inflamatorias, la supuración, la retracción del margen gingival a causa de la pérdida de los tejidos periodontales distales, la sensibilidad térmica, la movilidad y cambios en la posición de los dientes provocados por la pérdida de inserción y destrucción del ligamento periodontal (Herrera *et al.*, 2018).

Si bien el desarrollo de la periodontitis es causado por la acumulación de la placa dentobacteriana y la disbiosis del microbioma oral, existen ciertos factores de riesgo que contribuyen con este desarrollo, pudiendo ser extrínsecos como la higiene dental, el tabaco, el estrés, el uso de fármacos; e intrínsecos como el padecimiento de enfermedades sistémicas por ejemplo, la diabetes, capacidad de respuesta inmunológica, factores retentivos de placa, traumas o predisposición genética o hereditaria (Herrera *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2016). Las enfermedades periodontales pueden contribuir al estado inflamatorio del cuerpo empeorando la condición sistémica, tal es el caso de la diabetes (Kinane *et al.*, 2017), esta relación se explica a mayor profundidad en la **sección 1.5**.

### ***1.3. Microbiología bucal y microbioma oral***

El término microbioma fue acuñado por Joshua Lederberg como la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que literalmente comparten el espacio de nuestro cuerpo y aunque han sido ignorados son determinantes de la salud y enfermedad; entendiéndose por ende que el microbioma oral comprende el conjunto de microorganismos que se encuentran en la cavidad oral y zonas contiguas (Dewhirst *et al.*, 2010).

La comunidad bacteriana presenta un aproximado de 700 especies que pueden ser encontradas de manera común en la cavidad oral, pudiendo extenderse hasta 1,000 especies si se incluye a las arqueas (Wade, 2013). De las cuales alrededor de 280 han sido aisladas, cultivadas y nombradas de manera apropiada; por el contrario, se ha determinado que al menos la mitad de las bacterias que se encuentran en la boca no pueden ser cultivadas o aisladas por métodos tradicionales, complicando el estudio y comprensión del microbioma oral (Dewhirst *et al.*, 2010).

En consecuencia de la basta cantidad de microorganismos presentes en la boca, actualmente los estudios han dejado de lado la perspectiva del estudio individual y el efecto de un microorganismo en una enfermedad, siguiendo los postulados de Koch; y se han enfocado en el estudio de las comunidades bacterianas. Lo anterior ha sido posible, en parte, gracias a los avances tecnológicos y el uso del gen 16S del RNA ribosomal (rRNA), el cual permite la identificación y descubrimiento de un amplio espectro de bacterias. Sin embargo los nuevos microorganismos descubiertos por amplificación de este gen no pueden ser nombrados propiamente y cuentan con un nombre provisional (Dewhirst *et al.*, 2010).

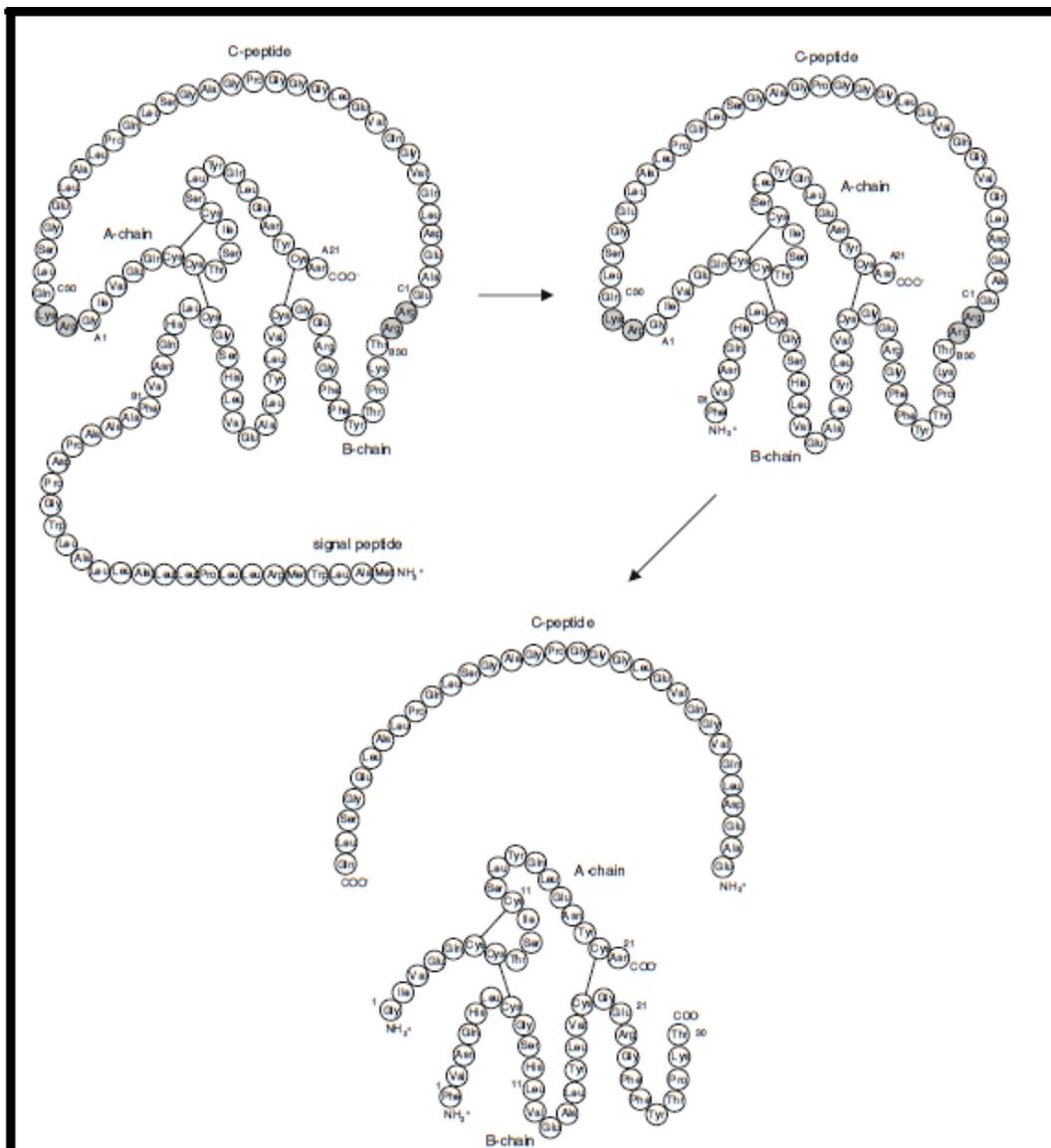
Los principales microorganismos, o sea la microbiota menos variable, que pueden ser encontrados en la boca están constituidos en un 96% por bacterias, específicamente de los grupos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes y Spirochaetes. El grupo de los Firmicutes es el más abundante comprendiendo el 36.7 % del total, seguido por Bacteroidetes y Proteobacteria, con 17.1% cada uno. Definir la composición precisa de este microbioma es difícil, ya que es un sistema sujeto a cambios dinámicos y que se ve afectado constantemente por el ingreso de bacterias externas por medio de la comida, agua y aire que ingresa a la boca (Wade, 2013; Verma *et al.*, 2018).

A diferencia de los encontrados en otros sitios anatómicos, los microorganismos presentes en la cavidad oral son causantes de las dos enfermedades más comunes: las caries y la periodontitis; sin embargo, esta relación y la necesidad de control externo de la comunidad bacteriana bucal aún no han sido identificadas (Wade, 2013). Un componente fundamental de la periodontitis es el perfil microbiológico que la componen, por lo cual el microbioma que caracteriza esta enfermedad ha sido ampliamente estudiado. Especialmente se ha enfocado en determinar las relaciones y abundancia de periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Belstrøm, 2020). Diversos estudios realizados en nuestro país son consistentes en la presencia de estos patógenos en la población mexicana, sin embargo en la mayoría de estos destaca la identificación y enfoque solo en los grupos bacterianos de interés y no en todo el microbioma oral (Contreras *et al.*, 2015).

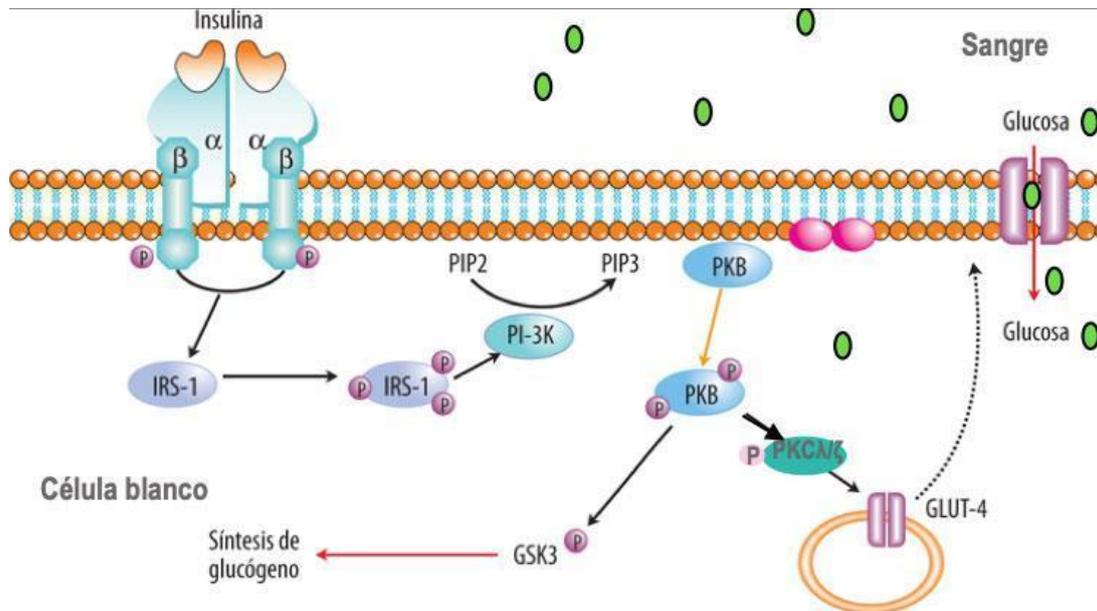
#### 1.4. Diabetes Mellitus

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que aparece cuando el páncreas ya no es capaz de generar insulina, los tejidos no pueden utilizar adecuadamente la insulina que se produce, o cuando la cantidad de insulina que produce no es suficiente (IDF, 2021).

La insulina es una hormona producida por las células  $\beta$  del páncreas y permite regular la cantidad de azúcares en la sangre, siendo fundamental para el transporte intracelular de la glucosa. Se trata de una hormona peptídica de 5,807 Da compuesta por dos cadenas de aminoácidos, la cadena A con 21 aa y la cadena B con 30 aa, conectadas por un par de puentes disulfuro (Figura 1.6). Esta proteína es almacenada en las mismas células hasta su secreción en el torrente sanguíneo. La exocitosis de la insulina es provocada por el ingreso de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de los canales de calcio en consecuencia de la despolarización de la membrana por el cierre de los canales de potasio. Una vez en el torrente sanguíneo tiene una vida media de 12 minutos, y es en este sitio en el que radica su importancia, pues promueve la reducción de la cantidad de glucosa en la sangre. La señalización de la insulina se activa cuando esta se une a la célula al acoplarse con el receptor de insulina (IR) el cual se autofosforila en residuos específicos de tirosina generando un sitio de unión para IRS-1, el cual es activado vía fosforilación y una vez activado, promueve la transducción de señales que desencadena la translocación de GLUT4 a la membrana celular (Figura 1.7), incrementando la cantidad de glucosa que es transportada al interior de las células de diferentes tejidos (Thevis *et al.*, 2010; Posner *et al.*, 2017).

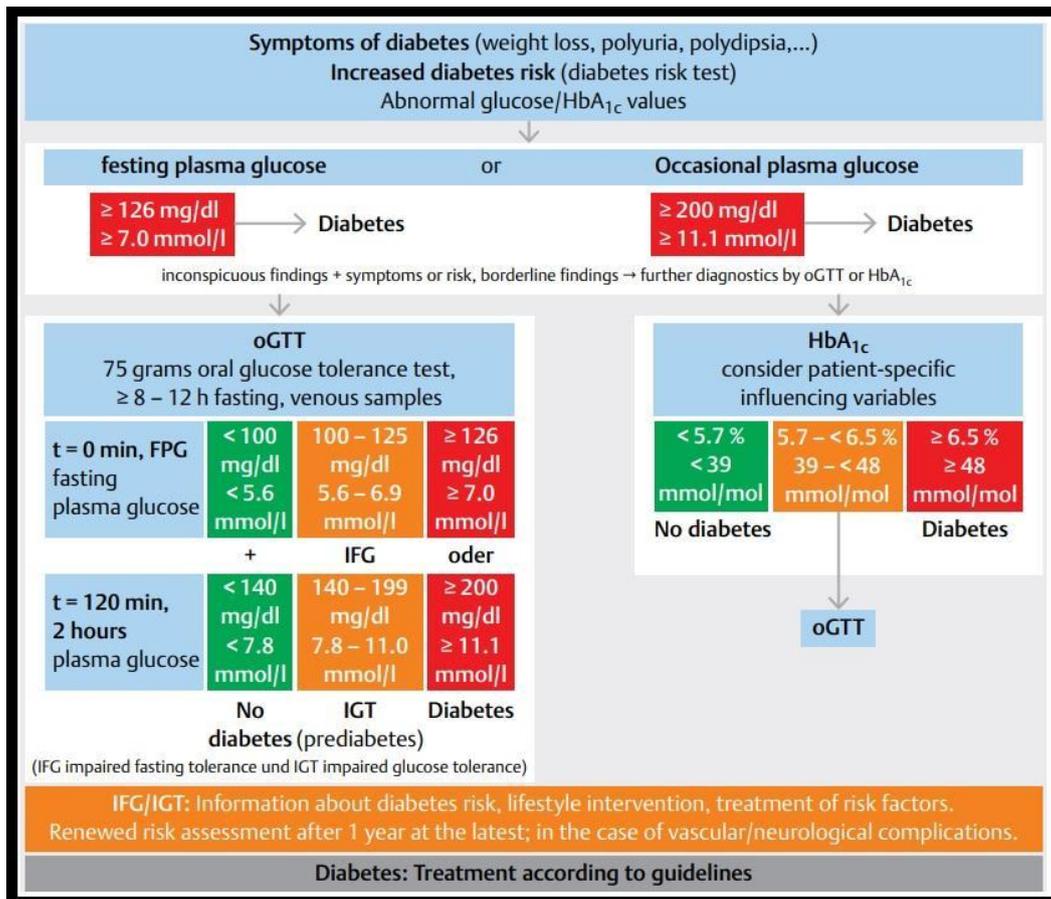


**Figura 1.6.-** Esquema de la insulina, aparecen las dos cadenas que la componen y en cada una de ellas se pueden observar los aminoácidos que contienen. Las líneas representan puentes disulfuro que conforman la estructura terciaria de la proteína (Thevis *et al.*, 2010).



**Figura 1.7.-** Vía metabólica que resume la acción de la insulina en la célula desde su acoplamiento a su receptor hasta la translocación de GLUT4.

El diagnóstico de la diabetes de acuerdo a la OMS incluye tres tipos de criterios (Figura 1.8) bajo los cuales puede ser obtenida basándose en los niveles de glucosa en plasma. El primero denominado glucosa plasmática en ayunas (FPG por sus siglas en inglés) se realiza cuando han pasado al menos 8 horas sin una ingesta calórica, en el cual es criterio de diagnóstico un nivel de glucosa plasmática  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L). El segundo análisis diagnóstico la curva de tolerancia a la glucosa, la cual mide el nivel de glucosa plasmática 2 h después de la ingesta oral de 75 g de glucosa (2h- PG u oGTT oral glucose tolerance test), cuyo valor debe ser  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L) para hacer el diagnóstico. Finalmente el tercer criterio es el porcentaje de hemoglobina glicosilada (A1C) que refleja el promedio de glucosa en sang्रे durante los últimos dos o tres meses, el valor de referencia es  $\geq 6.5\%$  para el diagnóstico. Alguno de estos tres análisis puede ser utilizado de manera indistinta para el diagnóstico de la diabetes, aunque los valores obtenidos deben ser concordantes (Thomas & Philipson, 2015; Petersmann *et al.*, 2019).



**Figura 1.8.-** Algoritmo para el diagnóstico de diabetes, extraído de las guías de práctica clínica de la Asociación Alemana de Diabetes (Petersmann *et al.*, 2019).

La diabetes puede ser clasificada en varios subtipos de acuerdo a las características específicas que desarrollan la patología. En este trabajo, únicamente nos enfocaremos en explicar los dos principales tipos de diabetes, sin embargo se reconoce que existen otros tipos de diabetes que no serán abordados, como la diabetes gestacional o la ocasionada por el uso de fármacos.

#### 1.4.1. Diabetes Mellitus tipo 1

La diabetes tipo 1, antes denominada diabetes insulino dependiente o diabetes infantil, es provocada por la destrucción inmunológica de las células  $\beta$  del páncreas. El sistema inmune ataca las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas, destruyéndolas o dañándolas lo que conlleva a la reducción y posterior eliminación de la producción de insulina. Esta patología está asociada a un defecto en el complejo de histocompatibilidad, específicamente en el antígeno humano de leucocitos (**HLA**). Además, debe existir la presencia de uno o más de estos marcadores autoinmunes: anticuerpos de células de los islotes, anticuerpos contra GAD (GAD65), tirosina fosfatasa IA-2 y IA-2b, y ZnT8. En jóvenes, la primera manifestación de la diabetes es por la presencia de cetoacidosis, y al contrario de lo que ocurre en el tipo 2, la obesidad no necesariamente antecede al diagnóstico. Además, es importante recalcar que las personas que sufren de este tipo de diabetes suelen estar predispuestas a otros desórdenes autoinmunes (ADA, 2018).

Cabe resaltar que el padecimiento de este tipo de diabetes puede tener una falta de etiologías. En estos casos no existen señales de autoinmunidad en las células pancreáticas, sin embargo, los pacientes sufren de episodios variados de cetoacidosis diabética y deficiencia de insulina entre esos episodios. Esta clase de diabetes es completamente hereditaria y se denomina idiopática, y comúnmente se encuentra en poblaciones de ascendencia africana y asiática (ADA, 2018).

La prevalencia de este tipo de diabetes está aumentando en la actualidad. Es imperativo supervisar y medir el nivel de los anticuerpos pancreáticos en familiares de aquellos que padecen diabetes tipo 1, para detectar personas con cierto grado de propensión a esta enfermedad, además de hacer del conocimiento de la población los síntomas y cuidado médico de esta enfermedad para poder identificarla a tiempo. Sin embargo, las pruebas clínicas en personas asintomáticas y con bajo riesgo aún no están recomendadas debido a la falta de procedimientos, aunque de dar positivo se tiene que tomar consejo médico acerca del riesgo de la cetoacidosis diabética, su prevención y el riesgo de padecer diabetes (ADA, 2018).

#### **1.4.2. Diabetes Mellitus tipo 2**

La diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM) está caracterizada por la resistencia a la insulina y la deficiencia de la misma, antes denominada diabetes no insulino dependiente, debido a que al menos al inicio, los individuos que sufren esta enfermedad no requieren un tratamiento de insulina para sobrevivir. Si bien la etiología de esta enfermedad aún no ha sido determinada, la mayoría de personas que la padecen sufren de obesidad o sobrepeso, este exceso de peso puede provocar cierto grado de resistencia a la insulina pero sin llegar a desarrollar diabetes (ADA, 2018).

La cetoacidosis diabética en este tipo de diabetes puede ocurrir de manera espontánea o surgir en consecuencia a otro evento como una infección o el uso de ciertos fármacos. El desarrollo de la T2DM suele pasar desapercibido durante muchos años debido a que la hiperglucemia se desarrolla lentamente y en sus primeras etapas no es lo suficientemente severa como para que los pacientes detecten los síntomas comunes de la diabetes. El riesgo de padecer T2DM es mayor con la edad, el sobrepeso, la sedentariedad, hipertensión y en ciertos grupos étnicos, además de que está asociada con una predisposición genética y herencia familiar de manera más marcada que en el tipo 1 (ADA, 2018).

Normalmente la T2DM se desarrolla cuando las células  $\beta$  son incapaces de compensar la resistencia a la insulina que ocurre normalmente. Existe información que sustenta la predisposición genética al fallo de estas células y muchas mutaciones han sido descritas; sin embargo, en la práctica clínica no ha sido posible determinar las anormalidades genéticas y los factores ambientales determinantes de la etiología. Existen dos hipótesis al respecto, la primera sostiene la glucotoxicidad en la cual la hiperglucemia crónica depleta los gránulos secretores de insulina en las células  $\beta$ ; mientras que la segunda se basa en la lipotoxicidad atribuyendo la disminución de insulina a los niveles altos de ácidos grasos libres (Thomas & Philipson, 2015).

El cribado de información utilizando herramientas que delimiten los factores de riesgo (Figura 1.9) y la realización de un análisis de diagnóstico como los que se mencionaron anteriormente (FPG, oGTT, etc.) son imperativos para que la detección oportuna de esta enfermedad sea adecuada. El seguimiento clínico y la observación de los síntomas es fundamental durante el desarrollo y padecimiento de esta, debido por ejemplo a que la duración de la carga glucémica es un fuerte predictor de resultados adversos. Además existen diversos tratamientos que evitan el desarrollo de T2DM en pacientes prediabéticos y también que reducen el riesgo de complicaciones comunes de la diabetes (ADA, 2018).

Criterios para evaluar diabetes o prediabetes en adultos asintomáticos
1. Sobrepeso u obesidad (BMI mayor a 25kg/m <sup>2</sup> ), uno o más de los siguientes criterios
<input checked="" type="checkbox"/> Parientes de primer grado con diabetes
<input checked="" type="checkbox"/> Etnicidad o raza con alto grado de riesgo (Afroamericanos, Latinos, Nativos americanos, Asiáticos, etc.)
<input checked="" type="checkbox"/> Historia de CVD
<input checked="" type="checkbox"/> Hipertensión (mayor a 140/90 mmHg o en terapia por ello)
<input checked="" type="checkbox"/> Nivel de colesterol HDL mayor a 35 mg/dL (0.90 mmol/L) y triglicéridos mayores a 250 mg/dL (2.82 mmol/L)
<input checked="" type="checkbox"/> Mujeres con síndrome de ovario poliquístico
<input checked="" type="checkbox"/> Inactividad física
<input checked="" type="checkbox"/> Otras condiciones clínicas asociadas con la resistencia a la insulina
2. Pacientes con prediabetes (A1C 5.7% [39 mmol/mol], IGT, o IFG)
3. Mujeres diagnosticadas con Diabetes gestacional
4. Otros pacientes mayores de 45 años
5. Si los resultados son normales, los análisis deben repetirse mínimo cada 3 años, considerando una mayor frecuencia dependiendo de los resultados y el estatus de riesgo
Categorías de riesgo elevado de diabetes y prediabetes
FPG 100 mg/dL (5.6 mmol/L) a 125 mg/dL (6.9 mmol/L)
2-h PG durante 75-g OGTT (IGT): 140 mg/dL (7.8 mmol/L) a 199 mg/dL (11 mmol/L)
A1C: 5.7 a 6.4% (39-47 mmol/mol)
En las tres pruebas el riesgo es continuo en el límite inferior y mayor cercano al superior

**Figura 1.9.-** Principales factores de riesgo y bases para el diagnóstico oportuno de T2DM.

Para el tratamiento de la diabetes tipo 2 la promoción de un estilo de vida que incluya una dieta sana, actividad física regular, no fumar y el mantenimiento de un peso corporal saludable es el primer paso. Si esto falla se suele iniciar la administración oral de medicamentos como la metformina. Si el tratamiento con un solo fármaco antidiabético no es suficiente, se dispone de una variedad de opciones de tratamiento conjunto. Finalmente si la medicación oral no es suficiente se pueden necesitar inyecciones de insulina. Además de las complicaciones que puede desarrollar un diabético, existe un grupo de enfermedades asociadas al estado diabético que pueden empeorar e incluso amenazar la vida de los pacientes, como las enfermedades cardiovasculares, la retinopatía, la nefropatía y las afecciones en miembros inferiores (IDF, 2019).

La diabetes y los niveles continuos de glucosa en sangre se asocian con una amplia variedad de enfermedades cardiovasculares que conjuntamente comprenden la causa principal de la morbilidad y la mortalidad en las personas con diabetes. Los tipos más frecuentes asociados con la diabetes son la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la arteriopatía periférica y la insuficiencia cardíaca congestiva. La arteriopatía periférica también es una causa importante de amputaciones en extremidades inferiores. En su conjunto, los padecimientos cardiovasculares representan entre un tercio y la mitad de todas las muertes por diabetes (IDF, 2019).

La retinopatía diabética es una complicación muy temida de la diabetes. Se sabe que es una de las principales causas de la ceguera en la población de edad activa. Actualmente existen datos inconclusos sobre la prevalencia de esta complicación, debido a la falta de información en distintas regiones, estos datos son vitales dado que el trastorno visual y la ceguera tienen un impacto devastador en la calidad de vida y en el estatus económico de las personas afectadas (IDF, 2019).

La nefropatía crónica en personas con diabetes puede ser el resultado de una nefropatía diabética o de otras afecciones asociadas como hipertensión, disfunción vesical, polineuropatía, entre otras. A nivel mundial, más del 80% de la nefropatía terminal está causada por la diabetes, la hipertensión, o una combinación de ambas, además, la prevalencia de la nefropatía terminal es hasta diez veces superior en las personas con diabetes que en aquellas que no la padecen. La hiperglucemia induce hiperfiltración y cambios morfológicos en los riñones que finalmente provocan un aumento de la excreción de albúmina en la orina (albuminuria), daño a los podocitos y pérdida de la superficie de filtración. Una vez que avanza a la fase 3, se necesita la dosificación de medicamentos hipoglucemiantes y de otra índole. Una

vez que la enfermedad avanza a los estadios 4 y 5 se requiere la diálisis, y usualmente el tratamiento de la anemia, hiperpotasemia y la carencia de fosfato. En algunos casos, se debe considerar el trasplante de páncreas y riñón (IDF, 2019).

La neuropatía periférica es la forma más frecuente de neuropatía relacionada con la diabetes, afecta a los nervios distales de las extremidades, en particular a los de los pies. Estas afecciones facilitan el desarrollo de úlceras como resultado de un traumatismo externo o a la distribución anormal de la presión ósea interna (lo que se conoce como “pie diabético”). Las complicaciones por pie diabético son graves y crónicas; consisten en lesiones en los tejidos profundos que se asocian con trastornos neurológicos e insuficiencia venosa periférica en las extremidades inferiores. La amputación de alguno de los miembros inferiores en personas con diabetes es de 10 a 20 veces más frecuente en comparación con aquellas que no padecen esta afección. Las personas con insuficiencia venosa periférica corren un mayor riesgo de amputación por pie diabético, isquemia de miocardio y apoplejía, con discapacidad a largo plazo y un mayor riesgo de muerte (IDF, 2019).

Finalmente la diabetes afecta negativamente a todos los tejidos blandos y duros que rodean los dientes, remarcando una relación entre esta enfermedad y diversas patologías orales entre las que destaca la periodontitis, más adelante se abordarán los mecanismos que relacionan estas dos enfermedades.

### 1.4.3. Epidemiología de la Diabetes

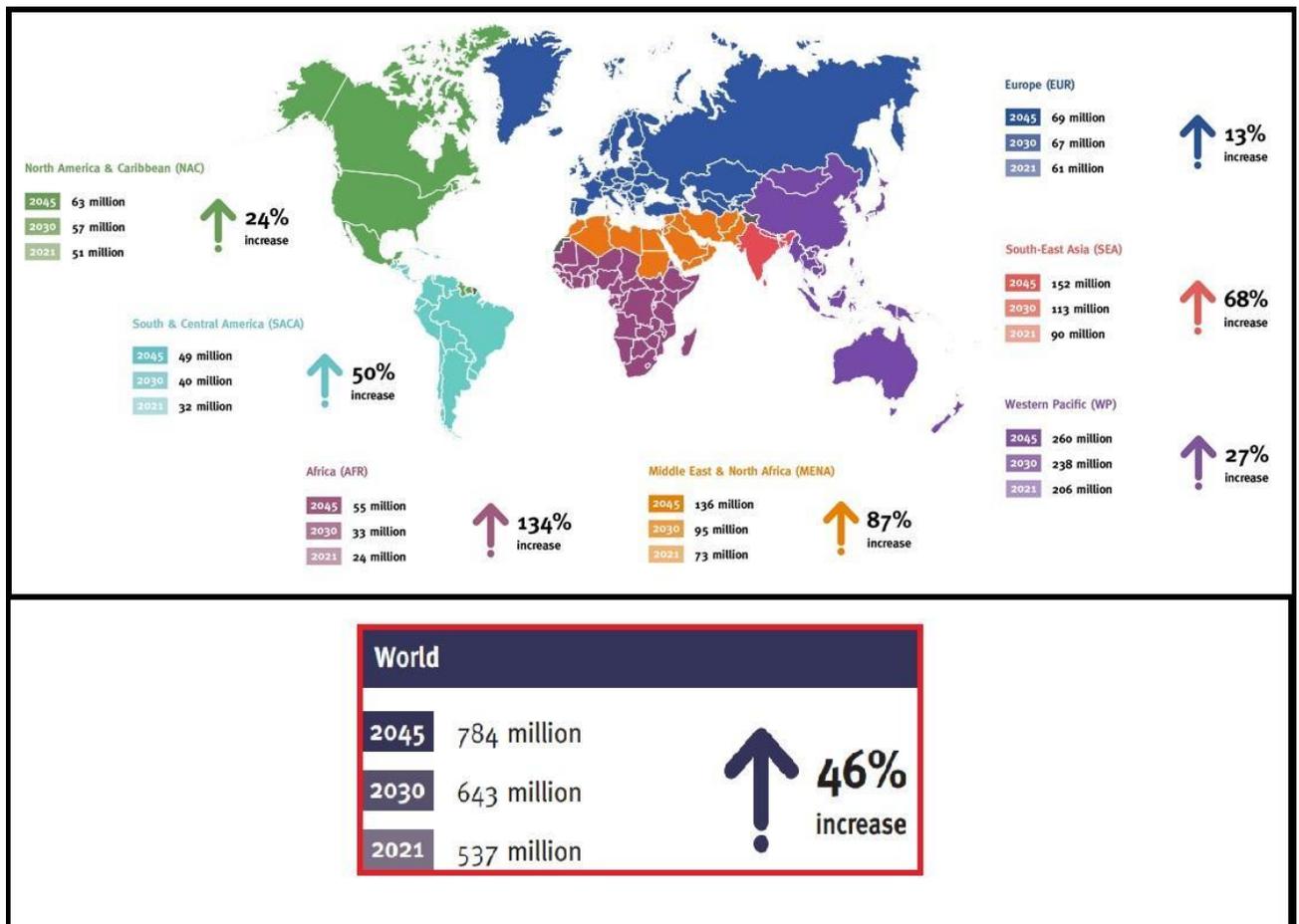
Se calcula que 537 millones de adultos entre 20 y 79 años en todo el mundo, o sea uno de cada diez adultos, tiene diabetes (Tabla 1.1); de los cuales el 81% viven en países de ingresos bajos y medios. Se prevé que para 2045 la cifra aumente a 784 millones de adultos diagnosticados con diabetes (Figura 1.10).



**Cantidad de adultos (20-69 años) con diabetes en la actualidad y proyecciones a futuro**

	2021		2030		2045	
	Cantidad de personas con diabetes (Millones)	Prevalencia (%)	Cantidad de personas con diabetes (Millones)	Prevalencia (%)	Cantidad de personas con diabetes (Millones)	Prevalencia (%)
<b>Mundial</b>	536.6	10.5	642.7	11.3	783.2	12.2
<b>Norte América y Caribe</b>	50.5	14.0	57	-	62.8	10.8

**Tabla 1.1.-** Estimaciones y proyecciones mundiales de la diabetes, tomado de la IDF (2021).



**Figura 1.10.-** Cantidad total calculada de adultos (de entre 20 y 79 años) con diabetes en 2021 (IDF, 2021)

Según la edad, la prevalencia es menor entre adultos de 20 y 24 años, siendo 2.2%; mientras que en los adultos entre 75 y 79 años la prevalencia de la diabetes es del 24%. Por sexo, la prevalencia calculada de diabetes en mujeres es del 10.2% un poco menor que el 10.8% en varones (IDF, 2021). China, India y Pakistán son los países con el mayor número de adultos con diabetes, mientras que México ocupa el 7mo lugar con alrededor de 14.1 millones de adultos que la padecen (Tabla 1.2).



### Top mundial de países con mayor cantidad de adultos con diabetes

País	Cantidad de personas con diabetes (Millones)
<i>China</i>	140.9
<i>India</i>	74.2
<i>Pakistán</i>	33.0
<i>Estados Unidos</i>	32.2
<i>Indonesia</i>	19.5
<i>Brasil</i>	15.7
<i>México</i>	14.1
<i>Bangladesh</i>	13.1
<i>Japón</i>	11.0
<i>Egipto</i>	10.9

**Tabla 1.2.-** Diez primeros países o territorios por cantidad de adultos (20-79 años) con diabetes en 2021 (IDF, 2021)

México está entre los primeros 10 países con mayor número de casos en el mundo y la diabetes representa una de las principales causas de muerte. Tan solo en 2020, un total de 151,019 personas fallecieron a causa de esta enfermedad, lo que corresponde a 14% del total de muertes registradas en ese año; con esto la diabetes se posicionó como la tercera causa de muerte en la población mexicana, sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares y COVID (INEGI, 2021).

### **1.5. Interrelaciones entre la diabetes Mellitus y la periodontitis**

La diabetes, al ser una enfermedad sistémica, se relaciona con otras enfermedades, como se mencionó anteriormente. Asimismo, existe evidencia que relaciona la periodontitis como una enfermedad adicional causada por la diabetes, siendo que otros aseguran que se trata de una relación bidireccional (Bascones-Martínez *et al.*, 2011).

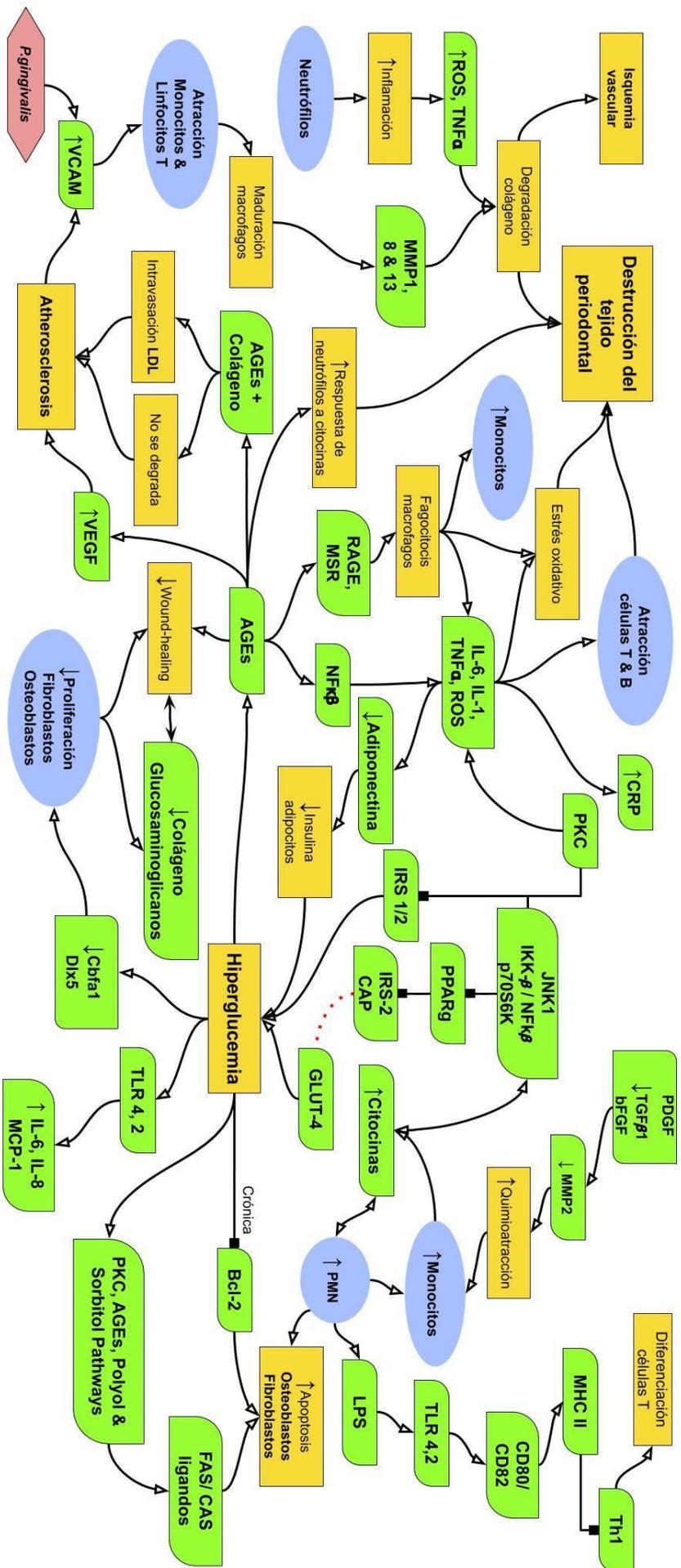
Esta relación ha sido descrita desde las primeras etapas de la periodontitis, en donde se ha observado que la prevalencia y severidad de la gingivitis es más alta en personas diabéticas, destacando de igual manera que estos pacientes presentan un mayor número de sitios inflamados y sangrado periodontal, sobre todo si el paciente cuenta con un historial de pobre control glucémico, dejando en evidencia la importancia de tener en cuenta el estado de control glucémico del paciente cuando se estudia la periodontitis. Además, en diferentes estudios longitudinales se observó que la diabetes puede actuar como un factor de riesgo para padecer periodontitis, y el número de casos de periodontitis aumenta conforme aumenta la edad (Mealey & Oates, 2006). En estudios epidemiológicos enfocados en indios Pima de Arizona, una de las poblaciones con mayor ocurrencia de diabetes tipo 2, se observó una relación en la prevalencia de características clínicas de periodontitis, tal es el caso de la pérdida de sujeción de las piezas dentales y la pérdida del hueso alveolar, que en los individuos con diabetes fue mayor en comparación con aquellos que no la padecían. El estudio de esta población ha permitido definir la relación que existe entre estas dos enfermedades, pues también ha hecho posible comprobar que la prevalencia de periodontitis aumenta en los individuos que padecen diabetes en comparación con los que no; marcando una relación clara entre las dos enfermedades y su coocurrencia (Shlossman *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1990).

Además de las relaciones epidemiológicas que existen entre las dos enfermedades, la comorbilidad de estas provoca el agravio del estado diabético, de acuerdo con reportes de pacientes con diabetes que presentan periodontitis corren seis veces más riesgo de que empeore su control glucémico en comparación con sujetos periodontalmente sanos, así mismo el porcentaje de pacientes con diabetes que sufren uno o más eventos cardio o cerebrovasculares es casi cuatro veces mayor (Mealey & Oates, 2006). Adicionalmente, los pacientes con diabetes con un grado avanzado de periodontitis padecen una tasa 2 veces mayor de muerte por isquemia cardíaca y 8 veces más alta de mortalidad por nefropatía en comparación con aquellos que no presentan periodontitis o es incipiente (Saremi *et al.*, 2005); remarcando la importancia de comprender la relación entre estas dos enfermedades para poder entender los cambios tan abruptos en el estado y mortalidad del padecimiento diabético.

Lo que está claro es que existe una relación entre ambas enfermedades y aunque los mecanismos que sustentan esta relación aún no están del todo determinados, se abordará esta relación desde los tres principales puntos de investigación concernientes en la actualidad: I) Factores biológicos de pacientes con diabetes que tienen un efecto en la periodontitis, II) Efecto y rol de la periodontitis en el control metabólico de la diabetes, y III) Respuesta sistémica en la diabetes por el tratamiento de la periodontitis.

#### **1.5.1. Factores biológicos de pacientes diabéticos que tienen un efecto en la periodontitis**

Los factores que tienen un efecto en la periodontitis pueden ser separados en tres grupos debido a la complejidad y respuesta sistémica que estos desencadenan; I) Factores microbiológicos, II) Factores inflamatorios y respuesta inmune, III) Hiperglucemia y efectos de los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) sobre la homeostasis de las células periodontales. En la figura 1.11 se puede apreciar un resumen de los mecanismos que se ven afectados en la diabetes y su influencia en la periodontitis, así como la convergencia de los cuatro grupos en distintas etapas del daño periodontal (Polak & Shapira, 2017).



**Figura 1.11.-** Resumen molecular de la interacción entre la diabetes y la periodontitis, destacando los eventos que convergen en ambas enfermedades además del agravio propio de cada una. En verde se marcan las moléculas involucradas tanto en la periodontitis como en la diabetes; en amarillo se destacan los principales efectos que ocasiona la secreción de las moléculas además de la respuesta que esta condición provoca; en azul se encuentran los principales tipos celulares involucrados en la interacción de estas dos enfermedades; y en rojo la participación de bacterias específicas. Las flechas marcan un efecto directo de respuesta, mientras que las líneas con punta de cuadro una inhibición del proceso y la línea punteada marca la pérdida de elementos claves para dichos procesos.

□

Factores microbiológicos: La comunidad bacteriana bucal y específicamente la periodontal presenta cambios composicionales durante la periodontitis en comparación con tejidos sanos. Estos cambios se ven exacerbados cuando la persona además padece diabetes. Zhou *et al.* (2013) describen cambios en la abundancia relativa de tres géneros y nueve OTUs, entre los que destaca el aumento de *Prevotella* y *Tannerella* en ausencia de diabetes, por otro lado los pacientes con diabetes presentan un aumento de *Neisseria* y *Pseudomonas*, y una disminución de *Corynebacterium matruchotii*, *Cardiobacterium valvarum*, *Neisseria flavescens*, entre otras especies; cabe destacar que estos doce OTUs fueron asignados por los autores como bacterias putativas de salud bucal, por ende la pérdida de estos grupos de bacterias en pacientes con diabetes puede predisponer a un riesgo de periodontitis elevado. Si bien en personas sanas existen diferencias en la composición bacteriana, los pacientes con periodontitis y diabetes también presentan cambios, de estos destaca el aumento relativo de *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Fusobacterium* y *Capnocytophaga* (específicamente *C. sputigena*, que es una bacteria fermentadora de glucosa), además de grupos asociados a la salud bucal (Ciantar *et al.*, 2005; Casarin *et al.*, 2012). Sin embargo, estos grupos bacterianos no son patógenos destacables para el desarrollo de periodontitis, mientras que los principales patógenos como *P. gingivalis* o *T. denticola* no presentan cambios entre personas con y sin diabetes, aunque en el caso de *T. forsythia* existe controversia sobre en qué grupo es más abundante (Sardi *et al.*, 2011; Field *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). En conclusión, el padecimiento de diabetes es un gran modificador del microbioma periodontal, las fluctuaciones en la abundancia de ciertos grupos y el aumento de bacterias asociadas a la salud en personas con diabetes y periodontitis es la evidencia primordial de los cambios que provoca la diabetes en el microbioma periodontal.

□

Factores inflamatorios y respuesta inmune: La periodontitis se caracteriza por una inflamación constante de la encía, la cual propicia una cadena de respuestas inmunes que provocan el deterioro de los tejidos periodontales. Varios estudios señalan que la diabetes y la hiperglucemia pueden causar la inducción de un estado hiperinflamatorio constante en el cuerpo, incluyendo la zona periodontal. La principal evidencia sobre el efecto de la diabetes en la zona periodontal es el aumento en los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Mealey & Oates, 2006; Chang & Lim, 2012; Polak & Shapira, 2017). Asimismo, el aumento de IL-17 ha demostrado provocar una disbiosis, generando un mayor grado de patogenicidad del microbioma oral, el cual, regresa a su estado original una vez que es bloqueada esta proteína. De esta forma, el control de la inflamación permite mantener un perfil bacteriano menos patógeno en los pacientes (Curtis *et al.*, 2009; Graves *et al.*, 2008). Existen varios mecanismos que explican el aumento en los niveles de estas proteínas así como los eventos que lo desencadenan. Principalmente la perturbación ocasionada por la diabetes en el sistema inmunológico causa daños en las células polimorfonucleares, lo que provoca una eliminación bacteriana inadecuada y promueve una proliferación selectiva de ciertos grupos de bacterias gram negativas. Lo anterior conlleva a un aumento en la liberación de citocinas debido a la activación de los monocitos ante los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. Por otro lado, la diabetes provoca una desregulación de factores de crecimiento, que actúan como citocinas antiinflamatorias, como PDGF, bFGF y TGF- $\beta$ 1. Este último tiene como función la activación de las metaloproteinasas de matriz extracelular, en específico la MMP-2, que es responsable de la inactivación de MCP-3, que al no ser inactivado permite que la respuesta inflamatoria se desarrolle (Iacopino, 2000; Khumaedi *et al.*, 2019). El rol del sistema inmunológico y los cambios que este sufre a causa de la diabetes son primordiales, ya que la zona periodontal es un sitio constantemente sujeto a ataques bacterianos, por ende la pérdida de efectividad de neutrófilos y la

exacerbación de la respuesta de monocitos y macrófagos juegan un papel clave en el deterioro periodontal causado por la periodontitis (Mealey & Oates, 2006).



*Hiper glucemia y efectos de los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) sobre la homeostasis de las células periodontales:* La evidencia principal sobre la interacción de la diabetes y la periodontitis es el aumento de los niveles de hemoglobina glicosilada HbA1c que existe en pacientes con un mal control glucémico y periodontitis avanzada. Siendo que en individuos con hiperglucemia prolongada las proteínas se glicosilan de manera irreversible formando productos finales de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés) Estas proteínas tienen múltiples efectos en la comunicación celular. En el sistema inmunológico, los neutrófilos en respuesta al contacto con AGEs amplifican su respuesta a citocinas, aumentando la respuesta inmunológica a la presencia de LPS bacterianos, lo que desencadena un incremento en la destrucción del tejido conectivo periodontal agravando la severidad de la periodontitis. Por otra parte, los AGEs al unirse a receptores de los monocitos activan el factor nuclear kappa  $\beta$  que promueve la transcripción de citocinas proinflamatorias causando destrucción tisular. Además, los AGEs pueden ser fagocitados por macrófagos o células endoteliales por medio del receptor de AGEs (RAGE) o MSR1, lo cual inducirá la proliferación de monocitos, la liberación de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y la liberación de citocinas proinflamatorias causando la activación de células B y T, las cuales tiene un rol en la destrucción del tejido aunado al daño causado por los radicales libres (Khumaedi *et al.*, 2019). En fibroblastos los AGEs promueven el arresto del ciclo celular y disminuyen la diferenciación de células madre mesenquimales, lo que disminuye la producción de nuevo colágeno, además que debido a la presencia de MMPs (MMP-1, MMP-8, MMP-13) por el aumento de macrófagos, provoca la degradación del colágeno recién formado. Adicionalmente, el colágeno se entrelaza con los AGEs provocando un cambio de solubilidad, esta fusión de proteínas las vuelve imposibles de degradar. En conjunto la presencia de colágeno no degradado y la falta de nuevo colágeno provocan una cicatrización no homogénea (alterando el proceso “wound-healing”), que vuelve susceptible la zona periodontal a la invasión bacteriana (Khumaedi *et al.*, 2019).

Por otra parte la hiperglucemia induce una disminución en la expresión de CBFA1 y DLX5 que son marcadores de diferenciación de osteoblastos, lo que indica que altos niveles de azúcar en sangre reducen la diferenciación de células óseas (Lu *et al.*, 2003). Aunado a este efecto existe evidencia adicional del aumento en la apoptosis de fibroblastos y osteoblastos periodontales en respuesta un estado hiperglucémico, esta muerte es mediada por el polyol, sorbitol, PKC y AGEs activando la ruta de apoptosis extrínseca mediada por el ligando Fas y las caspasas. Además la apoptosis puede ser inducida por la supresión de Bcl-2 cuando la hiperglucemia es crónica; y existe un aumento en la actividad de osteoclastos (Blakytyn *et al.*, 2011), que en conjunto se entienden como una pérdida de la viabilidad del tejido periodontal. En conclusión, el deterioro en la capacidad regenerativa del tejido periodontal, el aumento relativo en la muerte celular del tejido y la reabsorción ósea causados por la diabetes, promueven el daño del tejido periodontal de manera sinérgica con la periodontitis.

### ***1.5.2. Efecto y rol de la periodontitis en el control metabólico de la diabetes***

La destrucción del tejido periodontal y la progresión de la periodontitis tienen sus bases en la liberación de citocinas proinflamatorias en respuesta a la presencia de LPS bacterianos, esta respuesta inmunológica conlleva otras consecuencias sistémicas, siendo en el caso de los diabéticos la más importante promover la resistencia a la insulina, la cual puede ser fatal para la persona (Khumaedi *et al.*, 2019). La evidencia que existe ante este hecho es la relación comprobada entre el control diabético, medido en niveles de HbA1c en sangre, y el estado periodontal; y aunque existen diversos mecanismos propuestos, sobre los que hablaremos más adelante, que explican esta relación, la explicación a grandes rasgos es la translocación de los mediadores inflamatorios producto de la periodontitis a todo el sistema provocando la exacerbación de la diabetes (Polak & Shapira, 2018).

La principal vía afectada cuando este par de enfermedades convergen es el metabolismo de la insulina, provocando una resistencia parcial a esta hormona que por ende agrava la condición diabética. Esta resistencia a la insulina es mediada por las citocinas proinflamatorias que activan cinasas de serina tales como la c-JUN N-terminal cinasa (JNK1), el Inhibidor del Factor Nuclear Kappa- $\beta$  cinasa (IKK $\beta$ )/NF $\kappa$  $\beta$

y la S6 cinasa (p70S6K). Por su parte, JNK puede fosforilar al sustrato del receptor de insulina (IRS-1 & 2) suprimiendo la señalización de la insulina (Gurav, 2012; Khumaedi *et al.*, 2019). Asimismo, IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B y JNK1 inhiben al Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR $\gamma$ ), que al ser inactivado no promueve la transcripción de proteínas como la Catabolite-bound Activator Protein (CAP) y IRS-2 las cuales desarrollan un papel fundamental en la translocación de glucosa mediada por GLUT-4 (Gurav, 2012).

La asociación entre la periodontitis y la resistencia a la insulina ha sido probada en diferentes estudios, relación que debe ser tomada en cuenta para entender el rol de la periodontitis en el control metabólico de la diabetes, debido a que la resistencia a la insulina es uno de los principales factores de interés en el estado diabético. La resistencia a la insulina es comúnmente medida usando el índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) que permite, mediante una fórmula validada y bien establecida, precisar un valor numérico expresivo de resistencia insulínica; el aumento en el valor de este índice ha sido correlacionado con los principales parámetros clínicos que son evaluados en la periodontitis, comprobando la relación entre la periodontitis y la resistencia a la insulina. Por mencionar algunos ejemplos, existe una relación entre el aumento en la resistencia a la insulina y la profundidad de los sacos periodontales (Timonen *et al.*, 2011), el aumento en la pérdida de adhesión de las piezas dentales (Genco *et al.*, 2005) y la cantidad de TNF- $\alpha$  (Watanabe *et al.*, 2008).

La citocina TNF- $\alpha$  tiene un papel fundamental en la regulación de la resistencia a la insulina, mediando esta respuesta desde diferentes puntos, entre ellos impide la señalización de la insulina por la activación de quinasas como las JNKs, como se mencionó anteriormente. Además TNF- $\alpha$  incrementa el nivel de ácidos grasos libres circulantes, cuyos metabolitos inhiben la señalización de la insulina al estimular las quinasas PKC y IKK $\beta$ . Aunado al bloqueo de señalización, este factor reduce la estabilidad del mensajero de IRS-1, lo que conlleva a la resistencia a la insulina (Popa *et al.*, 2007; Gurav, 2012).

Además de provocar resistencia a la insulina, las citocinas proinflamatorias, específicamente IL-6 y TNF- $\alpha$  son elementales para la propiciar la inflamación por reactivos de fase aguda, entre ellos la proteína C reactiva (CRP), que al ser liberada por el hígado promueve el aumento del estado inflamatorio existente, el cual es un proceso determinante en la patogénesis de la diabetes (Gurav, 2012). Asimismo Chen y colaboradores (2010) encontraron una relación positiva entre los niveles séricos de CRP en relación con el aumento en la profundidad de los surcos periodontales, parámetro reconocido como exacerbación de la periodontitis; por ende, es posible que el aumento de CRP provocado por la periodontitis tenga un efecto perjudicial en el control glucémico de los diabéticos. Esto último fue comprobado por Demmer y colaboradores (2010) quienes encontraron que el cambio en HbA1c y el estatus periodontal es más fuerte entre los pacientes con niveles elevados de CRP sérica.

Finalmente, en personas con diabetes y periodontitis concomitante existen niveles altos de estrés oxidativo, el cual se explica parcialmente por la formación de peróxidos intracelulares a causa de TNF- $\alpha$  y el estado hiperactivo de neutrófilos causado por la periodontitis. La intensificación del estrés oxidativo compromete la función de las células  $\beta$  pancreáticas y promueve el aumento de HbA1c. Además, el estrés oxidativo conlleva al aumento en las vías proinflamatorias que tienen un papel fundamental en la patogénesis de ambas enfermedades, retroalimentando ambas respuestas. Cabe destacar que la afección de las células  $\beta$  debido al exceso de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) extracelulares como consecuencia de los neutrófilos hiperactivos en la diabetes aún es una hipótesis (Allen *et al.*, 2011).

### ***1.5.3. Respuesta sistémica en la diabetes por el tratamiento de la periodontitis***

En varios estudios sobre la relación entre estas dos enfermedades se ha concluido la posible existencia de un mejoramiento de la condición diabética cuando se somete un tratamiento (p.ej. la limpieza dental) para contrarrestar la periodontitis. El principal fundamento y más común hallazgo es la reducción de HbA1c en respuesta al decremento de los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , resultado del tratamiento periodontal (Mealey & Oates, 2006). Además de la disminución en los niveles de TNF- $\alpha$ , los niveles de CRP disminuyen tras el tratamiento de la periodontitis en diabéticos. La disminución de estas

proteínas proinflamatorias tiene un papel fundamental en el control metabólico evitando las complicaciones comunes en la diabetes (Artese *et al.*, 2015).

Por la evidencia presentada, es importante reconocer a la periodontitis como un factor de riesgo del síndrome metabólico, y la estrecha relación que conlleva con el desarrollo y progresión de la diabetes, enfatizando la falta de claridad en los mecanismos que esto conlleva, pero remarcando la posibilidad de mejora de ambas enfermedades cuando son tratadas sinérgicamente.

## 1.6. El microbioma y su estudio

El microbioma se define como el diverso consorcio de microorganismos de distintas clases, tales como bacterias, arqueas, virus, hongos, y protozoos que habitan un ecosistema particular, incluyendo regiones anatómicas, órganos y tejidos. Su genoma colectivo hace una contribución vital al metabolismo, la homeostasis energética y a la actividad inmunológica, entre otras actividades fisiológicas, por lo cual los organismos deben ser entendidos como entes complejos multi especie y cuyas interacciones permiten el adecuado funcionamiento del sistema (Barko *et al.*, 2018). El estudio del microbioma es primordial para entender completamente el funcionamiento de los organismos. Con esta premisa, los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH) en 2008 comenzaron uno de los proyectos más importantes en esta materia al fundar el Proyecto del Microbioma Humano (HMP) con el fin de caracterizar la complejidad del microbioma humano y su rol en la salud y enfermedad (HMPC, 2018).

El enfoque en este tipo de estudios fue gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y computación, debido que a lo largo de la historia el estudio microbiológico se había basado en un enfoque de análisis de cepas individuales; sin embargo en la mayoría de los microorganismos las condiciones necesarias para su cultivo no han sido logradas o simplemente no pueden ser igualadas debido a la necesidad de microambientes específicos. Este nuevo campo de estudio denominado metagenómica se enfoca en la investigación de las comunidades microbianas, examinando en conjunto la colección de genomas de esta comunidad, aumentando el alcance y comprensión de la interacción de dichos microorganismos (HMPC, 2018).

La metagenómica busca identificar los constituyentes genéticos del microbioma al analizar el genoma microbiano y caracterizar las interacciones tanto entre los microorganismos como con el hospedero, con el fin de comprender su papel en la patobiología de las enfermedades (Barko *et al.*, 2018). El entender las relaciones que sostienen los microorganismos y su papel en el estado del hospedero es fundamental debido a la evidencia que existe sobre la acción que desempeña el microbioma en distintas enfermedades, así como la relación benéfica que también aporta (Rajagopala *et al.*, 2017).

En las bacterias, el estudio del microbioma se ha basado en la secuenciación y análisis de las diferencias que presenta el gen 16S del rRNA. Este gen es sumamente importante, ya que ha sido utilizado debido a características específicas que presenta, las cuales incluyen sitios altamente variados entre taxones rodeados de sitios sumamente conservados durante la evolución, por lo cual ha sido denominado un gen diana. Otros enfoques del análisis del microbioma son el análisis del metaboloma, el metatranscriptoma y la secuenciación de genomas completos (WGS), *shotgun sequencing*). En este último se busca el entendimiento de todos los genomas presentes en el nicho ecológico, permitiendo también el estudio de los repertorios génicos de los microorganismos presentes, además de que incluye a todo tipo de organismos y no únicamente aquellos que presentan los genes diana que comúnmente se estudian (Barko *et al.*, 2018). Cabe destacar, que a pesar de las ventajas y características que otorga el uso del enfoque metagenómico también requiere una profundidad de secuenciación específica y una elevada potencia computacional, además de que precisa de un cierto grado de capacidad analítica computacional para el análisis de tan vasta información; es por esto y aunado al hecho que la mayoría de estudios clínicos en humanos han sido enfocados en el gen 16S rRNA, que la metodología a desarrollar en esta tesis será basada únicamente en el enfoque de una región de este gen (Knight *et al.*, 2018).

La identificación basada en la secuenciación del gen 16S rRNA se basa en aprovechar las regiones hipervariables y conservadas que se encuentran a lo largo del gen y que están presentes en un amplio grupo de procariontes. El diseño experimental se basa en el uso de oligonucleótidos universales dentro las regiones conservadas flanqueando una o más zonas hipervariables, con el fin de clasificar cada lectura a una entidad taxonómica específica (Davidson & Epperson, 2018).

En la actualidad la mayoría de los estudios enfocados al microbioma son descriptivos, señalando los grupos de microorganismos que se encuentran en distintas regiones anatómicas, sin embargo para entender completamente qué ocurre durante la disbiosis que provocan las enfermedades, es necesario también evaluar las relaciones que mantienen los distintos grupos microbianos entre ellos, considerando variables clínicas. Por lo anterior, es primordial aplicar al estudio clínico un enfoque semejante al

utilizado en la ecología de comunidades, el cual permita conocer las comunidades microbianas presentes, las relaciones que mantienen y su asociación con los cambios en el organismo del hospedero, para poder entender de manera más amplia y precisa el papel que desempeña el microbioma en la etiopatología de las enfermedades (Gilbert & Lynch, 2019).

## 2. *Justificación*

En México, la diabetes tiene una alta prevalencia, y al igual que la enfermedad periodontal está asociada con el desarrollo de diferentes padecimientos crónico-degenerativos. Los consorcios bacterianos causales de la periodontitis son heterogéneos y están asociados a determinantes fisiológicos y de estilo de vida. En pacientes diabéticos, un control metabólico deficiente aumenta la gravedad de la inflamación gingival y altera la composición de la microbiota, disminuyendo la diversidad bacteriana y aumentando la proporción de bacterias patógenas. Además, en pacientes que padecen diabetes la periodontitis genera una mayor gravedad de esta enfermedad crónica, impactando en la calidad de vida del paciente. La identificación bacteriana por métodos bioquímicos requiere del aislamiento y cultivo de cada especie presente en la cavidad oral, una importante limitación. Por ello, la identificación genotípica del microbioma por secuenciación del gen 16S rRNA en pacientes que padecen periodontitis es una importante alternativa, ya que puede mejorar el diagnóstico así como el conocimiento de las especies bacterianas que participan en el desarrollo de esta patología. Este trabajo permitirá comprender mejor la complejidad de los consorcios bacterianos causales de la enfermedad periodontal en el contexto de pacientes diabéticos.

### 3. *Objetivos*

#### 3.1. *Objetivo General*

Realizar un análisis integrado de la diversidad bacteriana salival y las características clínicas de pacientes diabéticos y no diabéticos empleando un enfoque metagenómico de casos y controles.

#### 3.2. *Objetivos Particulares*

- 1.1. Organizar una base de datos con la información clínica de los pacientes que padecen periodontitis. O
- 1.2. Caracterizar la composición del microbioma oral en pacientes que padecen periodontitis. C
- 1.3. Identificar la relación estadística que existe entre la periodontitis y la diabetes de acuerdo con la distribución de especies bacterianas. I
- 1.4. Comparar las diferencias entre la diversidad bacteriana salival de personas con diabetes y sin diabetes. C
- 1.5. Evaluar la asociación entre la presencia de especies bacterianas y las características clínicas de los pacientes. E

#### **4. *Hipótesis***

Las modificaciones en el sistema inmunológico de los pacientes con diabetes proporcionan un medio adecuado para el desarrollo de bacterias específicas en el periodonto, causando el aumento relativo de sus poblaciones en el desarrollo de la enfermedad periodontal y por ende una diferencia significativa en la composición de la comunidad bacteriana en comparación con pacientes sin diabetes.

## 5. *Material y Métodos*

### 5.1. *Toma de muestra y criterios*

Las muestras fueron obtenidas del Hospital de Gineco Obstetricia y Medicina Familiar No. 60 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se realizó la toma de muestra a todos los pacientes, solicitando un volumen no menor de 0.5 mL de saliva sin estimular en tubos eppendorf de plástico estériles de 1.5 mL que fueron rotulados con un número consecutivo de muestra. Las muestras se congelaron de manera inmediata con hielo seco para evitar la degradación de DNA a causa de las enzimas propias de la saliva, posteriormente se mantuvieron en congelación a -80 °C hasta la extracción del DNA genómico.

Las muestras obtenidas se utilizaran en diversos proyectos, por lo que al momento de su recolección se tomaron de manera indiscriminada. Para este trabajo se seleccionaron 100 muestras que cumplieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- *Criterios de inclusión:* Pacientes mayores de 18 años, derechohabientes del IMSS con signos claros de padecer periodontitis (confirmado de manera visual por un odontólogo experto), padecer o no diabetes mellitus (confirmado por el paciente), y firmar la carta de consentimiento informado.
- *Criterios de exclusión:* Toda muestra proveniente de un paciente que haya estado sometido a tratamientos antibióticos en el mes previo a la toma de muestra, pacientes que padezcan alguna enfermedad cuyo agente biológico requiera infraestructura de bioseguridad mayor de 2 para su manejo y pacientes que no poseen dientes naturales.
- *Criterios de eliminación:* Muestras cuyo rendimiento total de DNA no fue suficiente para el desarrollo del proyecto.

### 5.2. *Extracción de DNA genómico (gDNA)*

Las muestras de saliva se procesaron para el análisis de microbiomas como se ha descrito anteriormente (Janem *et al.*, 2017). Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 4 °C durante 15 minutos a 1500 x g. El sedimento obtenido después de la centrifugación fue resuspendido en 300 µL de solución de lisis (20 mg/mL de lisozima en Tris-HCl 20mM, pH 8,0; EDTA 2 mM; Tritón X-100 al 1,2% ) y se incubó a 37 °C durante 1 h.

La extracción del gDNA se realizó con el *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen) según las especificaciones del fabricante. El kit de extracción tiene como fundamento la precipitación alcohólica del DNA y su adsorción a una columna de sílica, mediante la formación de puentes salinos y de hidrógeno por la presencia de sales caotrópicas. (Katevatis *et al.*, 2017).

### 5.3. *Verificación de la calidad del gDNA*

La calidad del gDNA se evaluó de acuerdo a tres características esenciales para la preparación de bibliotecas:

- *Integridad:* Se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, tiñendo el DNA con bromuro de etidio [10 mg/mL], los geles se revelaron en *Gel Doc EZ System* (Bio-Rad), exponiéndolos a luz UV para capturar la imagen.
- *Pureza:* Se determinó de acuerdo al cociente de absorbancia 260/280, medido por espectrofotometría en el equipo *NanoPhotometer NP80* (Implen).
- *Concentración:* Se obtuvo por fluorometría de alta sensibilidad utilizando un fluoróforo específico para DNA de doble cadena (**dsDNA**) y se cuantificó en el equipo *Quantus Fluorometer* (Promega).

Teniendo en cuenta las características anteriores, se determinó si las muestras contaban con las tres características para la preparación de bibliotecas para secuenciación; de no tenerlas se seleccionó un nuevo espécimen de la cohorte de muestras obtenidas.

Finalmente las muestras fueron diluidas o concentradas a 25 ng/μL para la amplificación.

#### 5.4. Amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA

La amplificación de las regiones V3-V4 se hizo de acuerdo al protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* (Illumina), el cual consiste en la amplificación de la región de interés mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La amplificación se realizó con oligonucleótidos degenerados, los cuales fueron seleccionados como los mejores por Klindworth y colaboradores (2013); además de añadir adaptadores de secuenciación universales para el equipo Miseq (Illumina) dentro de la secuencia de los oligos. La secuencia de ambos oligonucleótidos es la siguiente:

- “*Forward*” = 5’  
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
- “*Reverse*” = 5’  
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

La PCR se realizó en un volumen de 50 uL totales, utilizando la enzima *GoTaq Green Master Mix* (Promega) y añadiendo 100 ng totales de DNA y se colocó en el termociclador con el siguiente programa:

- 95 °C por 3 minutos
- 35 ciclos de:
  - 95 °C por 30 segundos
  - 55 °C por 30 por 30 segundos
  - 72 °C por 30 segundos
- 72 °C por 5 minutos
- Mantener 4 °C hasta el siguiente paso

Con lo anterior se generó un amplicón de 550 pares de bases (bp) aproximadamente. La amplificación fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, tiñendo el DNA con bromuro de etidio, revelándose en *Gel Doc EZ System* (Bio-Rad), por exposición a luz UV para capturar la imagen.

Los amplicones fueron purificados utilizando perlas magnéticas *AMPure XP* (Beckman Coulter), cuyo fundamento se basa en la captura por carga magnética del DNA y la selección de tamaños se hace con base en la proporción de perlas añadidas de acuerdo al volumen de la reacción. La purificación se llevó a cabo de la siguiente manera,

- Se añadieron 45 uL (proporción 0.8X) de perlas *AMPure XP* al tubo de PCR, se mezcló con vortex y se centrifugó por un par de segundos para condensar todo el volumen de reacción en el fondo del tubo. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Los tubos se colocaron en gradillas magnéticas por 5 minutos, después se retiró el total del sobrenadante y se desechó.
- Sin retirar de la gradilla magnética, se lavó con etanol al 80 % recién preparado, dejando reposar por un minuto después de añadir el etanol y desechando después de cada lavado.
- Las perlas se dejaron secar al aire, una vez secas se añadieron 20 uL de H<sub>2</sub>O grado biología molecular, se mezcló con vortex y se centrifugó por un par de segundos. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Los tubos fueron colocados en gradillas magnéticas por 5 minutos, después se tomaron 18 μL (que contenían el DNA) y se colocaron en tubos *Eppendorf* estériles de 1.5 ml estériles.

Para corroborar que se recuperó DNA de la purificación se cuantificó por fluorometría, como se explicó anteriormente.

### 5.5. *Indización de bibliotecas*

La adición de índices para la secuenciación masiva se hizo mediante una PCR de ciclos limitados, para la cual fueron utilizados el paquete de índices Nextera XT v2 (Illumina). La PCR fue realizada en un volumen final de 25 uL, utilizando la enzima *GoTaq Green Master Mix* (Promega), de los cuales 5 uL corresponden al DNA proveniente de la reacción anterior, como se especifica en el manual de Illumina; las reacciones fueron colocadas en el termociclador con el siguiente programa:

- 95 °C por 3 minutos
- 8 ciclos de:
  - 95 °C por 30 segundos
  - 55 °C por 30 por 30 segundos
  - 72 °C por 30 segundos
- 72 °C por 5 minutos
- Mantener 4 °C hasta hasta el siguiente paso

Posteriormente las reacciones fueron purificadas con perlas AMPure XP de la misma manera que se describió previamente, únicamente cambiando la proporción de perlas a 1.12 X; y se cuantificó la concentración final de las bibliotecas de secuenciación.

### 5.6. *Normalización de bibliotecas para secuenciación*

El tamaño de las bibliotecas de secuenciación esperado de acuerdo al manual es de 630 bp, sin embargo se corroboró mediante electroforesis de alta resolución en el equipo Bioanalyzer (Agilent Technologies) para obtener el tamaño real de la biblioteca, además de corroborar que no existían amplicones adicionales.

Con el tamaño de la biblioteca se calculó la concentración molar de las muestras, utilizando la siguiente fórmula,

$$\text{Concentración (nM)} = \frac{\text{Concentración en ng/L} \times 660 \text{ g/mol}}{\text{tamaño promedio de la biblioteca} \times 106}$$

y posteriormente fueron diluidas a una concentración de 4 nM para mezclar una alícuota de todas las muestras y obtener el *pool* final.

### 5.7. *Secuenciación*

La secuenciación se realizó en el equipo MiSeq (Illumina) en un formato de 2 x 250 ciclos, a una concentración 12.5 pM con una concentración de *phiX* al 3%. La demultiplexación de las muestras será solicitada dentro del análisis que hace el secuenciador y los archivos crudos FASTQ en ambos sentidos se descargaron de la nube virtual *Base Space Sequencing Hub*.

### 5.8. *Análisis Bioinformático*

Debido a la secuenciación de tipo *paired end*, las secuencias R1 y R2 contenidas en los archivos FASTQ fueron ensambladas utilizando el software PEAR v0.9.11 con una calidad de ensamblaje >30 en la escala de calidad PHRED (Anexo 1), y una longitud mínima de 400 bp. Además, para asegurar la calidad de los datos y optimizar los resultados, se realizó un *trimming* o corte de los 20 primeros nucleótidos y posteriormente se controló la calidad de las secuencias eliminando todas aquellas que estén por debajo de PHRED 30 utilizando el programa FASTX-Toolkit (Hannon, 2010).

El análisis del microbioma se hizo con ayuda del software Quantitative Insights Into Molecular Ecology 2 (QIIME 2; Bolyen *et al.*, 2019) de la siguiente manera:

- Las secuencias de buena calidad obtenidas previamente fueron importadas al formato de QIIME 2 (.qza). Estas secuencias fueron cortadas a 410 bp utilizando el *plugin* DADA2, derreplicadas

(proceso que consiste en individualizar o diferenciar secuencias con base en distintos parámetros) y filtradas por calidad PHRED >30. Utilizando la función *denoising* se eliminaron las lecturas falsas positivas causadas por errores del secuenciador y finalmente se eliminaron las quimeras; que son artefactos creados por el ensamblador de dos secuencias no relacionadas unidas por complementariedad incompleta de bases.

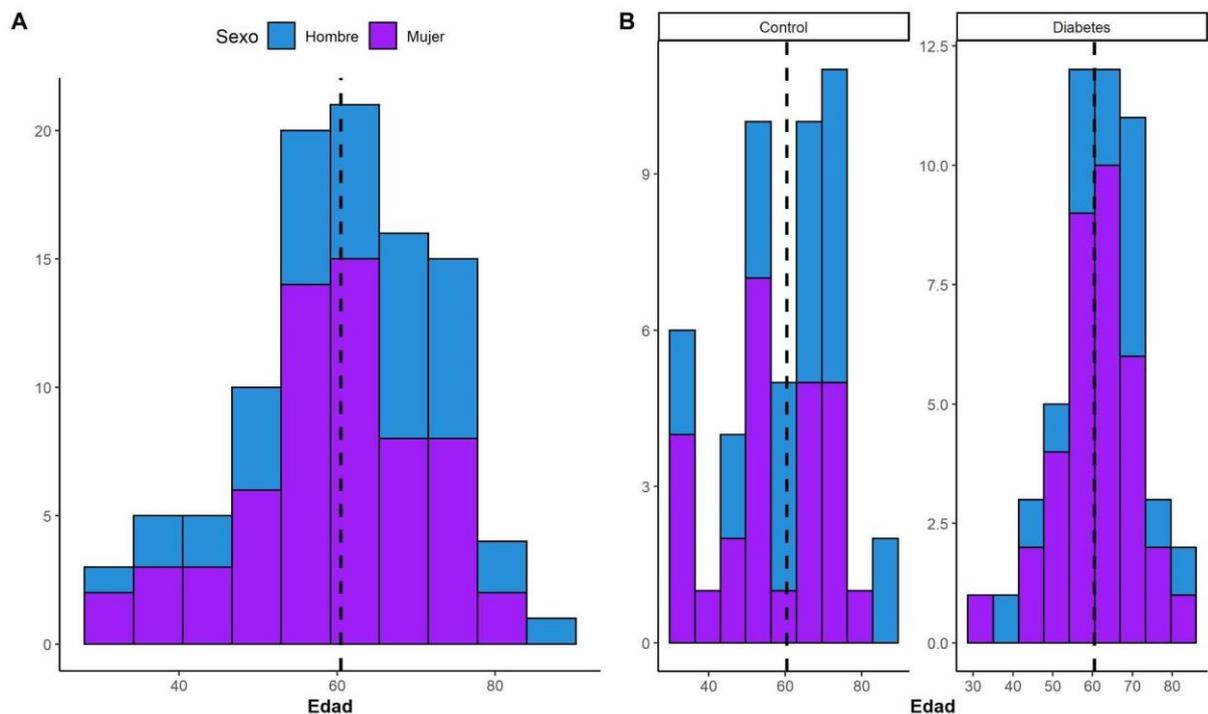
- Una vez obtenidas las secuencias individualizadas o Unidades Taxonómicas Operativas (OTU), se obtuvieron los parámetros ecológicos diversidad alfa, utilizando los índices de Shannon, Dominancia y Número de OTUs; y la diversidad beta, con los índices de Jaccard y Bray-Curtis. Además, se realizaron curvas de rarefacción para verificar la eficiencia de la secuenciación y la representatividad de los datos.
- La asignación taxonómica de las lecturas se hizo comparando con la base de datos SILVA 132 (Yilmaz *et al.*, 2014). Además se graficó la abundancia relativa de cada nivel taxonómico de las muestras.

## 6. Resultados

### 6.1. Muestras y descripción de la población

Se recolectaron un total de 451 muestras de saliva durante el periodo de agosto a diciembre de 2018, de las cuales se seleccionaron 100 que cumplieron con los criterios de inclusión (*Sección 5.1*). De estas muestras, 50 son pertenecientes a pacientes con diabetes (grupo de diabetes) y 50 a pacientes sin diabetes (grupo de controles). A pesar de que los pacientes del grupo control no padecen diabetes pueden padecer alguna otra enfermedad, como se describe a continuación.

El intervalo de edad de las muestras va de los 30 a 86 años con un promedio de 60.46 +/- 12.39 años (Figura 6.1A), siendo en el grupo de diabetes 61.54 +/- 10.68 y en los controles de 59.18 +/- 13.89 (Figura 6.1B). En ambos grupos la proporción de mujeres es ligeramente mayor que la de hombres, 70% y 52% en diabetes y controles, respectivamente (Tabla 6.1). Debido a la falta de información al momento de la toma de muestra, los datos de altura, peso e índice de masa corporal (**IMC**) están incompletos y únicamente disponibles en 44 de las 100 muestras seleccionadas por lo que no serán utilizados para los análisis posteriores.



**Figura 6.1.-** A) Histograma de edad del total de las muestras seleccionadas. B) Histograma de edad de cada grupo. Las barras de color azul indican la cantidad de hombres, mientras que el color morado representa las mujeres. La línea punteada está marcada en el promedio de edad.

	Diabéticos			Controles			Total	
	n	(%)	%N	n	(%)	%N	N	(%)
<b>Sexo</b>								
Mujeres	35	70%	35%	26	52%	26%	61	61%
Hombres	15	30%	15%	24	48%	24%	39	39%
<b>Etapa Periodontal</b>								
Leve	10	20%	10%	11	22%	11%	21	21%
Moderada	16	32%	16%	15	30%	15%	31	31%
Grave	24	48%	24%	24	48%	24%	48	48%
<b>Fumadores</b>								
No	40	80%	40%	44	88%	44%	84	84%
Si	10	20%	10%	6	12%	6%	16	16%
<b>Comorbilidad</b>								
No	17	34%	17%	20	40%	20%	37	37%
Hipertensión	25	50%	25%	26	52%	26%	51	51%
Hipertensión/Otra	5	10%	5%	4	8%	4%	9	9%
Hipotiroidismo	3	6%	3%	0	-	-	3	3%
<b>Cepillado Diario</b>								
Nunca a una vez	5	10%	5%	6	12%	6%	11	11%
Dos a tres veces	40	80%	40%	42	84%	42%	82	82%
Más de tres veces	5	10%	5%	2	4%	2%	7	7%
	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Min-Max</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Min-Max</b>		
<b>Edad</b>	61.74	10.68	35-86	59.18	13.89	30-83		
<b>Peso</b>	71.31	10.22	53-92	69.72	11.78	52-107		
<b>Altura</b>	1.59	0.09	1.45-1.80	1.57	0.10	1.45-1.86		
<b>IMC</b>	27.91	3.32	20.96-35.20	28.24	4.92	18.79-41.09		

**Tabla 6.1.-** Descripción de las características clínicas de las muestras, se incluye el número de individuos (n), la proporción que estos representan intra grupos (%), de la muestra (%N), y en la columna del total el acumulativo de esa variable dentro de la muestra.

Los padecimientos concomitantes reportados por los pacientes son la hipertensión, niveles altos de colesterol y triglicéridos, e hipotiroidismo, entre otras morbilidades no relevantes para este estudio. Estas comorbilidades fueron agrupadas por la hipertensión, como se muestra en la tabla 6.1, el listado completo con el resto de enfermedades se encuentra en el Anexo 2.

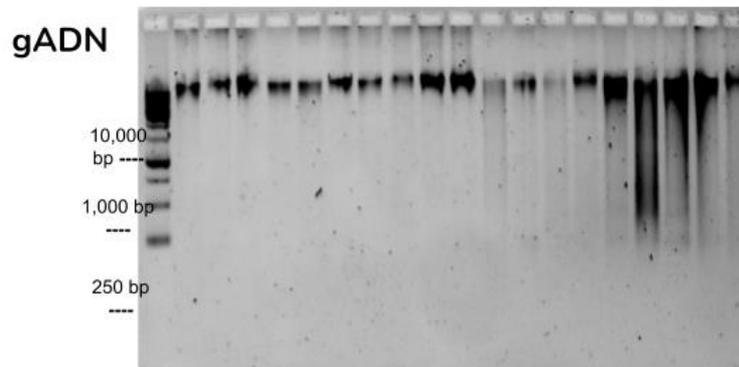
El tabaquismo se midió de manera categórica por su consumo en un periodo menor a un año. Se observó que la mayoría en ambos grupos de estudio no fumaban. Por otro lado, el cepillado diario se clasificó de manera categórica en función de las respuestas más comunes agrupandolas en i) nunca a una vez, ii) dos a tres veces y iii) más de tres veces al día; siendo que dos a tres veces al día fue la respuesta más común en ambos grupos (tabla 6.1).

Finalmente la etapa periodontal fue descrita por el dentista en turno y clasificada en función de la severidad de la periodontitis. La periodontitis grave fue la más común en ambos grupos, seguida de la moderada y finalmente la leve.

## 6.2. Extracción y evaluación de la calidad del gDNA

Debido a la naturaleza fisicoquímica de la saliva y la presencia de distintos tipos de enzimas, en ella la degradación del DNA sucede de manera acelerada. Sin embargo la calidad de DNA extraído de manera general fue buena. Las muestras extraídas presentaron una banda de alto peso molecular (>10 Kbp) lo que se refleja en una buena integridad del gDNA. Sin embargo, algunas muestras presentaron un barrido

que en algunos casos llegó a los 250 bp (Figura 6.2; el resto de geles de integridad se presenta en el Anexo 3.1), esta variabilidad en la calidad del DNA puede ser atribuida a distintos factores preanalíticos, especialmente al tiempo transcurrido de almacenamiento en congelación, previo a su extracción (Garbieri *et al.*, 2016).



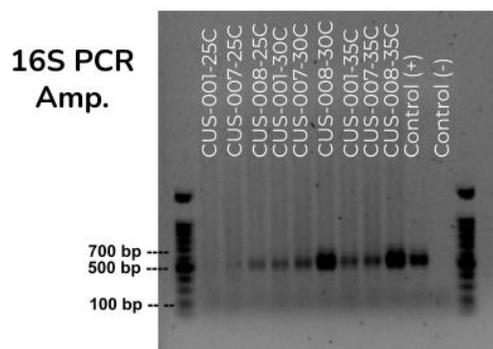
**Figura 6.2.-** Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio y revelado por irradiación UV, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular y en los carriles subsecuentes se encuentran 5  $\mu$ L de la muestra de ADN.

La extracción del gDNA de las 100 muestras se realizó con el total de la saliva recolectada que iba desde 0.5 a 1.5 mL, a causa de esto el rendimiento presenta una importante variación desde 156 hasta 29,000 ng totales, con un promedio de 6,548.2  $\pm$  5,338 ng de gDNA. En todas las muestras la cantidad de DNA fue suficiente para proseguir con la amplificación por PCR (En el Anexo 3.2 se enlista el rendimiento total de cada muestra).

### 6.3. Amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA y preparación de bibliotecas genómicas

La amplificación de las regiones de interés se realizó por una PCR de punto final. Se hizo una estandarización con el fin de conocer la cantidad de DNA molde requerido para obtener un rendimiento óptimo para la elaboración de las bibliotecas de secuenciación, dando como resultado que 100 ng iniciales de gDNA son la mejor opción para lograr bandas nítidas (Anexo 3.3).

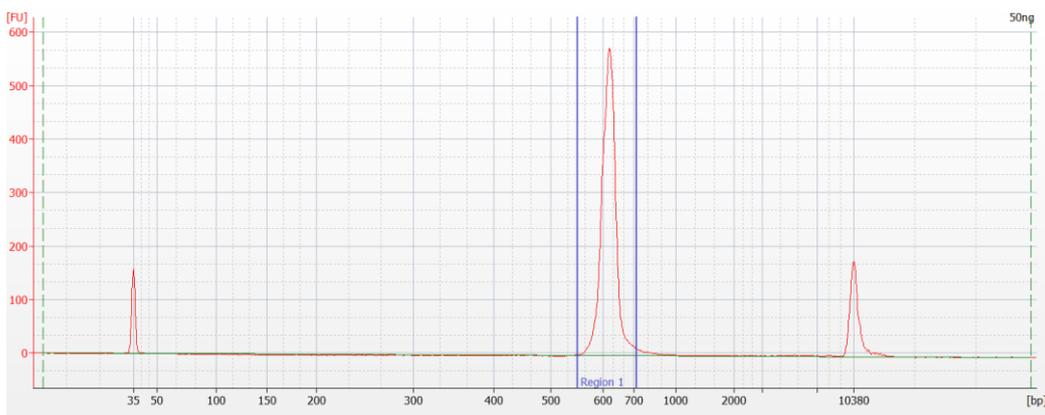
Las PCR fueron realizadas con 100 ng de gDNA total y se corroboró la amplificación de la región esperada cargando 5  $\mu$ L de la reacción en un gel de agarosa al 1.5%. En términos generales, en todas las muestras existió una banda única (Figura 6.3, Anexo 3.3) del peso esperado (550 bp), la claridad de la banda depende de la eficiencia de amplificación.



**Figura 6.3.-** Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y revelado por irradiación UV. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular que va desde los 100 bp en la banda inferior hasta los 1,000 bp. En todas la muestras se observa una banda a los 550 bp resultado de la amplificación

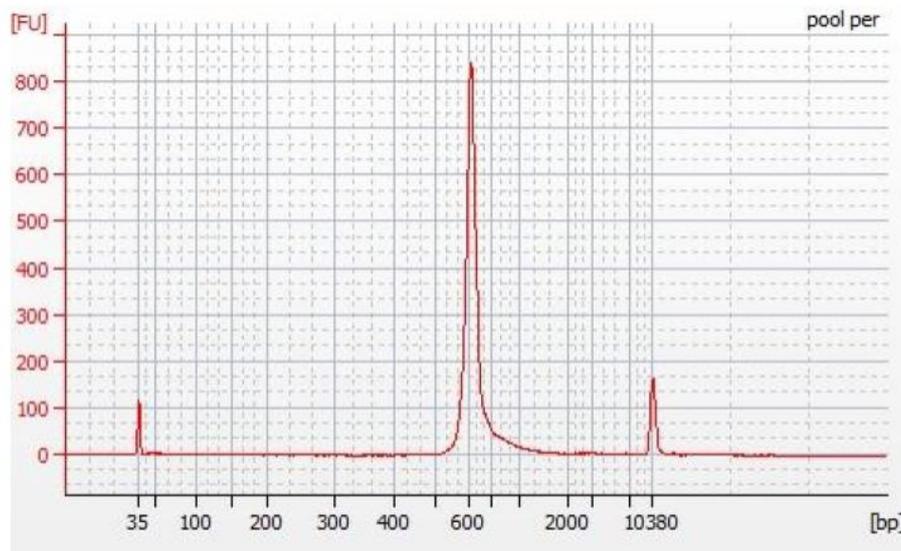
por PCR del producto esperado, y debajo de los 100 bp una banda que corresponde a los restos de oligos de la reacción.

El rendimiento de DNA posterior a la purificación presentó variabilidad, como se observa en los geles de amplificación (Figura 6.3), debido a la calidad del DNA inicial y probablemente la presencia de DNA del paciente proveniente de descamación celular, lo que puede reducir la eficiencia de amplificación (Cuevas-Córdoba & Santiago-García, 2014; Lluch *et al.*, 2015). La adición de etiquetas moleculares se realizó con los índices Nextera V2, siguiendo la relación que se muestra en el Anexo 3.2. Se cuantificó el DNA después de la purificación y se obtuvieron rendimientos más homogéneos debido a la PCR de ciclos limitados y a que esta amplificación no depende de la calidad del DNA, ya que solo se amplifican los resultados de la PCR anterior (Illumina Manual). Finalmente para conocer la calidad de la biblioteca final se realizó una verificación por electroforesis de alta resolución en un chip de Bioanalyzer. El tamaño de las bibliotecas finales resultó de 620 bp aproximadamente, concordando con lo indicado en el manual de los reactivos, además de contar un solo amplicón y sin evidencia de contaminación (Figura 6.4, Anexo 3.4).



**Figura 6.4.-** Electroferograma de alta resolución obtenido en Bioanalyzer. El eje x determina el tamaño en pb de los amplicones, mientras que el eje y la intensidad detectada. Se observa un pico único alrededor de los 620 bp que corresponde al amplicón de interés una vez añadidos los adaptadores universales y *barcodes*.

Siguiendo nuestro protocolo de control de calidad, se realizó un muestreo con muestras tomadas al azar para el análisis de electroforesis de alta resolución. Una vez que las muestras fueron ecualizadas a una concentración equimolar (4 nM) y mezcladas en un *pool*, este fue observado por electroforesis de alta resolución para corroborar que no existiera contaminación y que el tamaño del *pool* fuese similar al tamaño establecido al realizar la dilución equimolar (Figura 6.5), siendo el resultado similar con un pico alrededor de los 620 bp se procedió a la secuenciación.



#### POOL final (Todas las muestras)

**Figura 6.5.-** Electroferograma de alta resolución obtenido en Bioanalyzer del *pool* de muestras. El eje x determina el tamaño en pb de los amplicones, mientras que el eje y la intensidad detectada. Se observa un pico único alrededor de los 620 bp que corresponde al amplicón de interés una vez añadidos los adaptadores universales y sus respectivos *barcodes*.

#### 6.4. Secuenciación

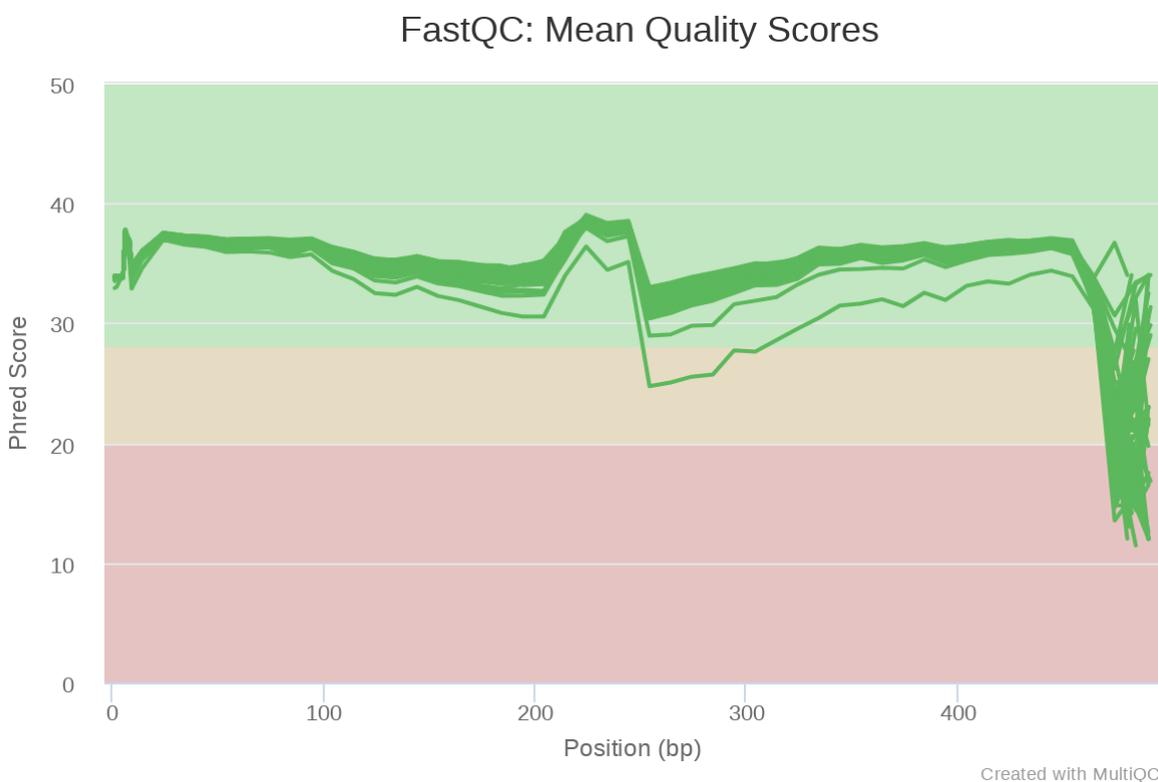
La secuenciación se realizó en un formato de 2 x 250 ciclos con una concentración de 12.5 pM del *pool*, con lo que se esperaba obtener un promedio de 100,000 lecturas por muestra. Una vez terminada se obtuvo un rendimiento de 9.92 Gbp y el 83.6 % de las bases con una calidad >30 PHRED. Se corroboró la ecalización de las muestras de acuerdo al número de lecturas identificadas por sus etiquetas posterior a la asignación de lecturas por muestra que realizó el secuenciador (en promedio 0.68% de la *flow cell* por muestra). la muestra **CUS-IMSS-0021** presentó un menor número de lecturas (52,101), esta muestra fue secuenciada nuevamente a una mayor profundidad pero los resultados fueron similares, lo cual indica un error desconocido en la muestra, posiblemente asociado a los adaptadores de secuenciación. A pesar de esto las demás muestras contaron con mayor homogeneidad en el número de lecturas, por lo que se continuó con el análisis bioinformático.

#### 6.5. Análisis bioinformático: control de calidad

Una vez descargados los archivos de secuenciación en formato fastq se evaluó su calidad y se ensamblaron las lecturas *forward* y *reverse*. Las muestras tuvieron un promedio de 127,762 (Tabla 6.2) lecturas ensambladas, todas con una calidad promedio mayor a 30 en la escala PHRED (Figura 6.6). Se observó un ligero aumento en el centro, resultado del empalme de los extremos de cada lectura. En el anexo 4.1 se encuentra una descripción detallada de los parámetros de calidad sobre la secuenciación de estas muestras.

	<i>Ensambladas</i>	<i>Finales</i>	<i>Eliminadas</i>	<i>(%)</i>
<i>Min</i>	46,781	12,973	23,912	-
<i>Max</i>	169,638	128,681	55,062	-
<i>Promedio</i>	127,762	89,468	38,294	29.97%
<i>Desv.Est.</i>	19,362.86	17,267.29	6,264.04	-
<i>Mediana</i>	128,773	90,719	38,235	-
<i>Totales</i>	12,776,183	8,946,787	3,829,396	29.97%

**Tabla 6.2.-** Número de lecturas promedio por muestra, durante los distintos filtros y análisis.



**Figura 6.6.-** Calidad PHRED de las muestras ensambladas por base. Cada línea representa una muestra. El eje x representa cada base secuenciada, mientras que el eje y corresponde al promedio de la calidad de esa base secuenciada.

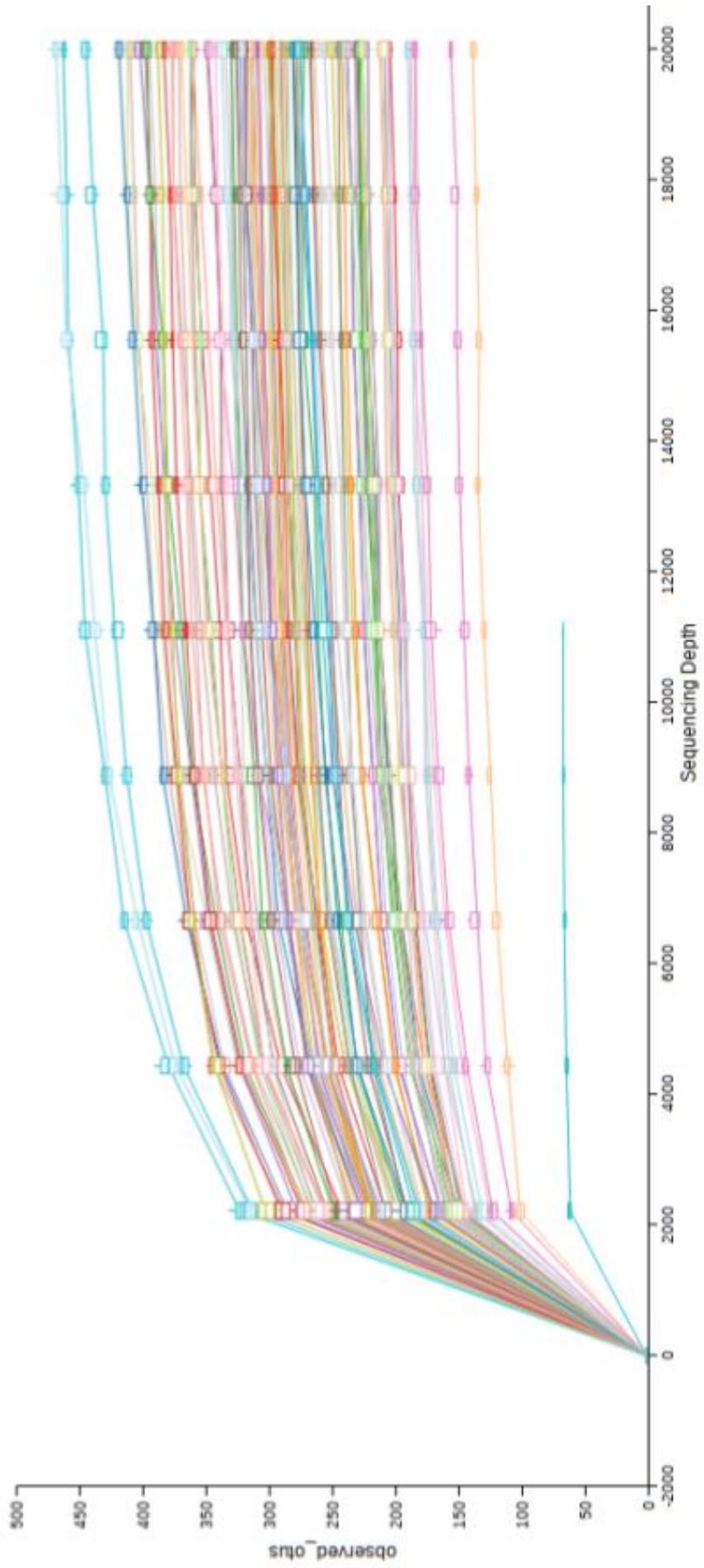
Una vez ensambladas y con la calidad necesaria, los archivos fueron importados al formato requerido por QIIME 2 (.qza) y se hizo la individualización de secuencias con el plug-in DADA2 además de delimitar las lecturas a 410 bp eliminando las últimas 20 bases de la secuencia, con el fin de obtener una

mayor diversidad al excluir la zona de hibridación de los oligos. Se obtuvieron 8,946,787 lecturas totales en las 100 muestras, teniendo 89,468 +/- 17,267.29 lecturas promedio por muestra. En el Anexo 4.2 se enlista el número de lecturas por muestra.

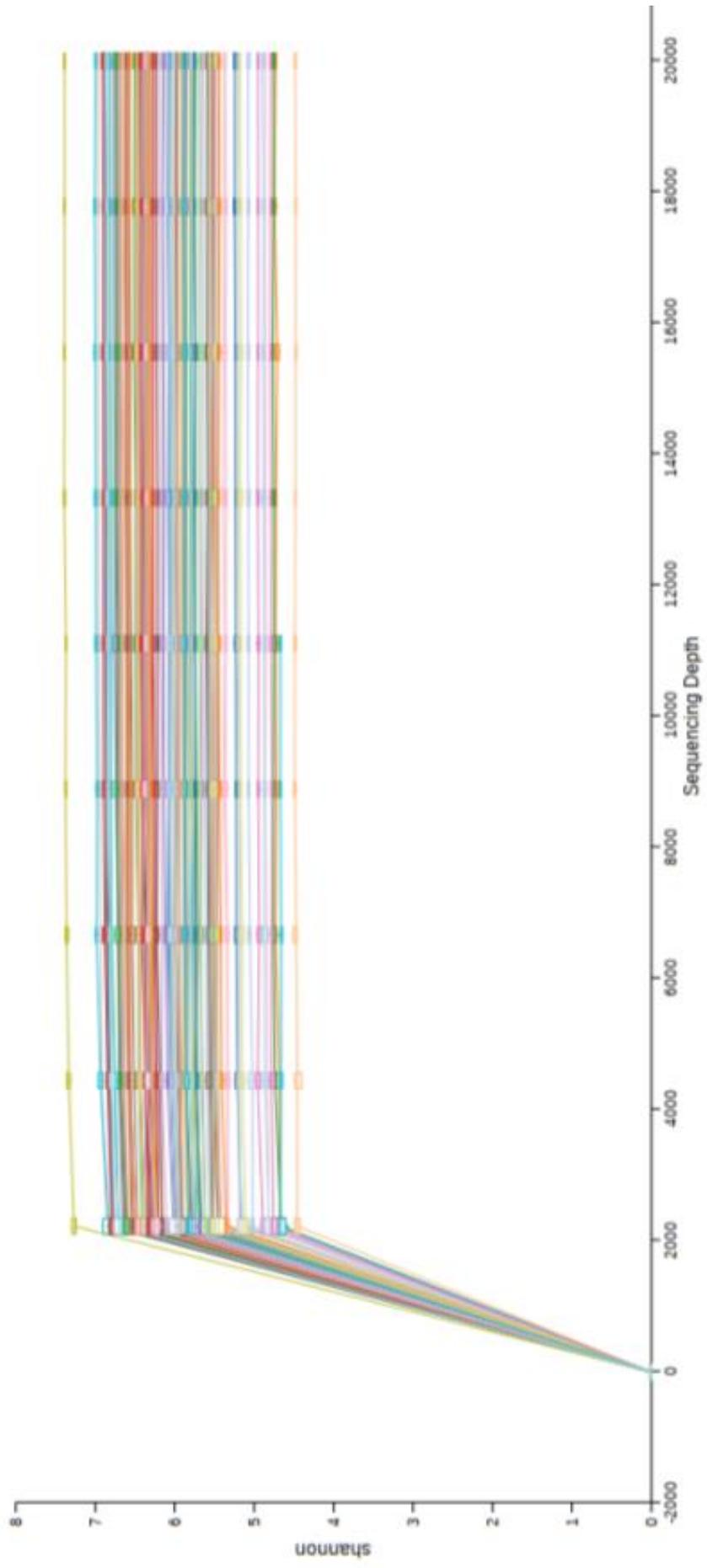
#### **6.6. Análisis bioinformático (Parámetros ecológicos)**

Para determinar la eficiencia de la secuenciación y conocer si la profundidad de secuenciación logró abarcar la complejidad de la comunidad bacteriana, se realizaron curvas de rarefacción utilizando el número de OTUs y la diversidad de Shannon por muestra. En las curvas podemos observar que desde 2,000 lecturas de profundidad, estas comienzan a presentar un comportamiento asintótico, el cual, nos indica que aún si aumentamos la profundidad de secuenciación el número de OTUs nuevos que podríamos observar sería mínimo (figura 6.7A). Incluso la muestra con menos OTUs y lecturas (CUS-IMSS-0021) mostró este comportamiento. Asimismo, cuando evaluamos cómo afecta la profundidad a la diversidad de Shannon de las muestras observamos un comportamiento idéntico al mencionado anteriormente (figura 6.7B), indicándonos que aún cuando pudieran existir OTUs no detectados, estos no afectarían la diversidad en las muestras y por ende podemos afirmar que este estudio abarca de manera significativa la comunidad bacteriana bucal presente en la totalidad de las muestras.

A



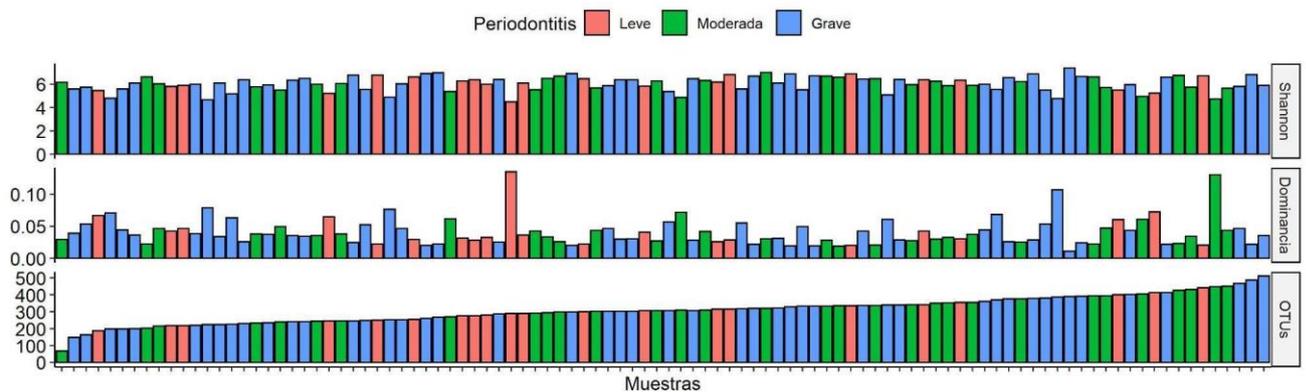
B



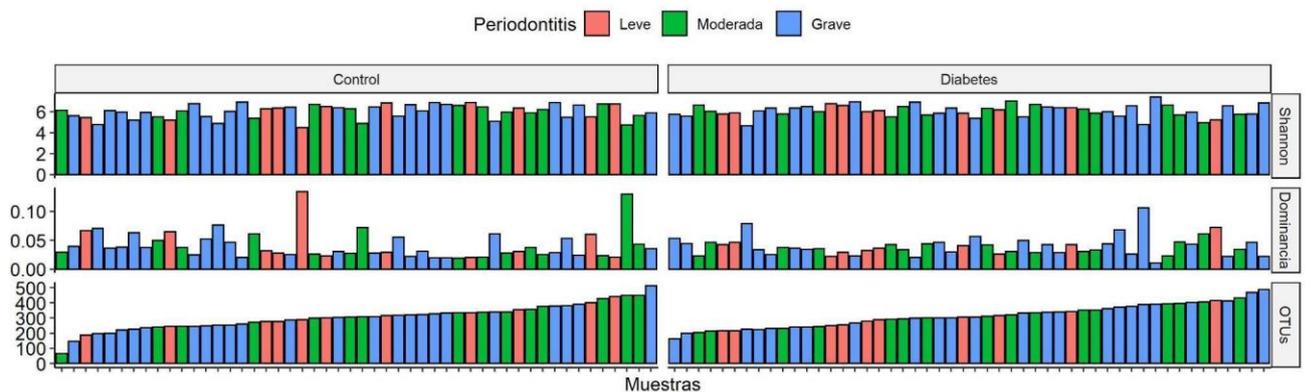
**Figura 6.7.-** (A) Curva de rarefacción por muestra, el eje  $x$  representa la profundidad de secuenciación, en el eje  $y$  se encuentra el número de OTUs, la curva se realizó con base en 10 puntos de profundidad, en los cuales se calculó el valor por iteración en las muestras. (B) Curva de rarefacción por muestra, el eje  $x$  representa la profundidad de secuenciación, en el eje  $y$  se encuentra el valor de diversidad de Shannon.

Las lecturas finales corresponden a un total de 7,830 OTUs en todas las muestras. Con estos datos se procedió al cálculo de parámetros ecológicos tales como la diversidad (alfa –o por muestra, y beta –o en conjunto). La muestra CUS-IMSS-21 tuvo el menor número de OTUs con 67 y CUS-IMSS-98 el mayor con 511 OTUs, siendo la más alta (figura 6.8A), en promedio se tienen 308.74 +/- 78.36 OTUs por muestra. Además se calculó el valor de diversidad alfa utilizando el índice de Shannon y un índice de dominancia para establecer la homogeneidad en la presencia de los OTUs. La diversidad de Shannon en las muestras fue de 4.48 a 7.38 con un promedio de 6.04 +/- 0.67; la dominancia se encontró entre 0.01 y 0.13, en promedio 0.04 +/- 0.02. Al separar las muestras entre diabéticos y controles, el promedio de OTUs fue de 312.64 ( intervalo: 67-511 OTUs) y 304.84 (164-487 OTUs) respectivamente; y no se observó una relación entre el número de OTUs y la etapa periodontal.

**A** Índices de Diversidad Alfa

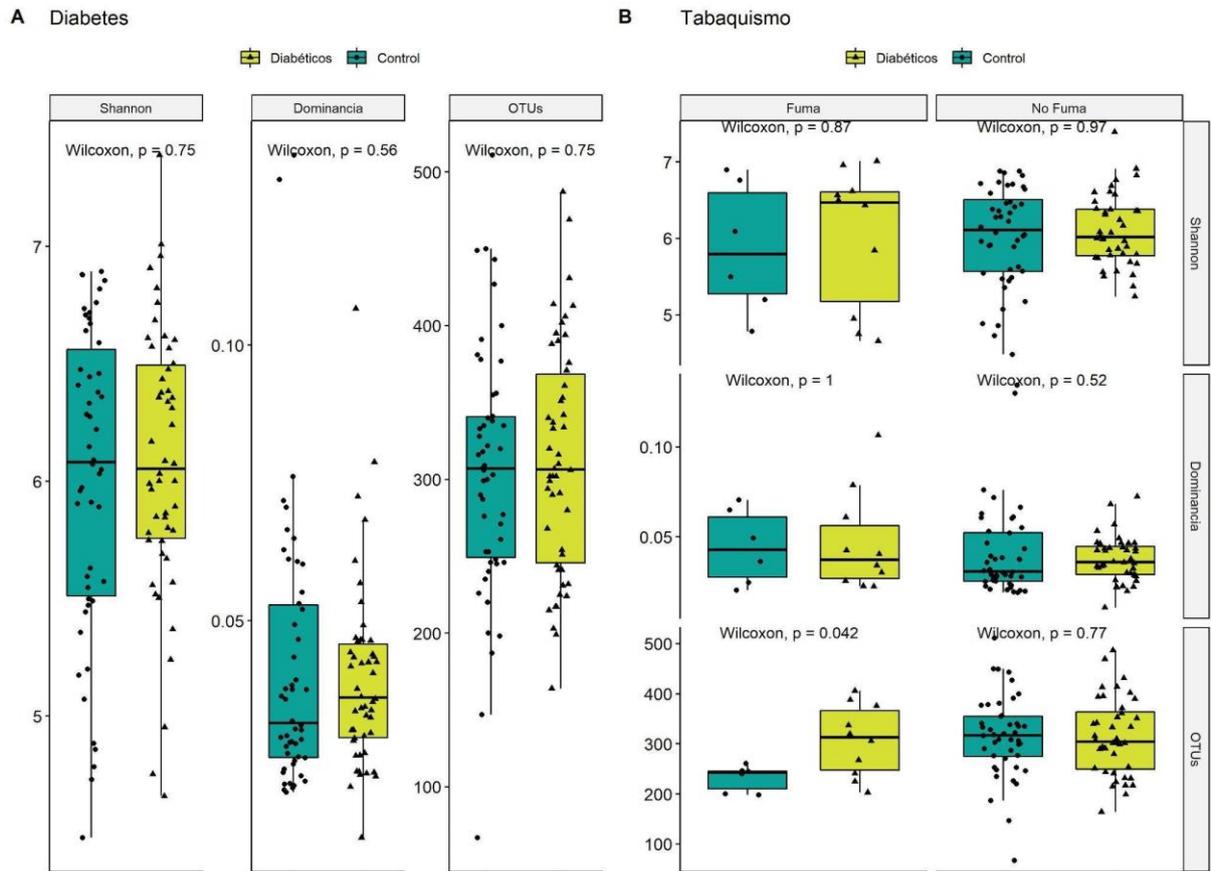


**B** Índices de Diversidad Alfa por Grupo



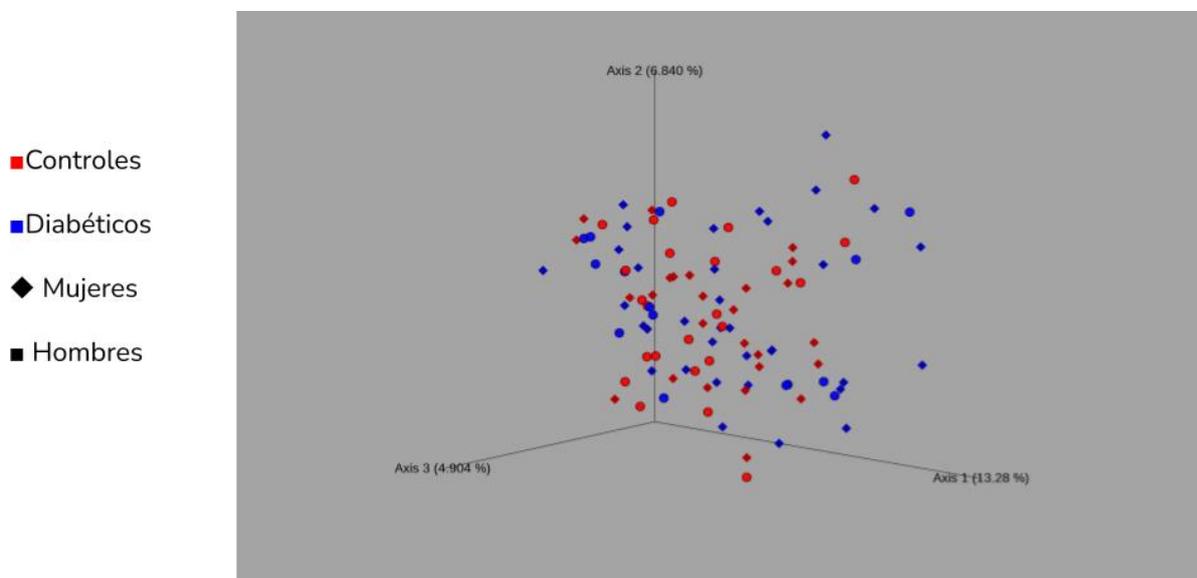
**Figura 6.8.-** (A) Descripción de la diversidad alfa por muestra, número de OTUs, Shannon y dominancia. (B) Diversidad alfa de diabéticos y controles por separado.

Además de obtener los valores de tendencia central, se hizo una comparación de medias con la prueba de Wilcoxon para saber si existía una diferencia en la diversidad entre diabéticos y controles, con base en las variables observadas. Únicamente el número de OTUs en diabéticos fue mayor que en los controles dentro del grupo de los fumadores (figura 6.9, en el anexo 5 se encuentran las gráficas de cajas con las comparaciones de las variables adicionales).



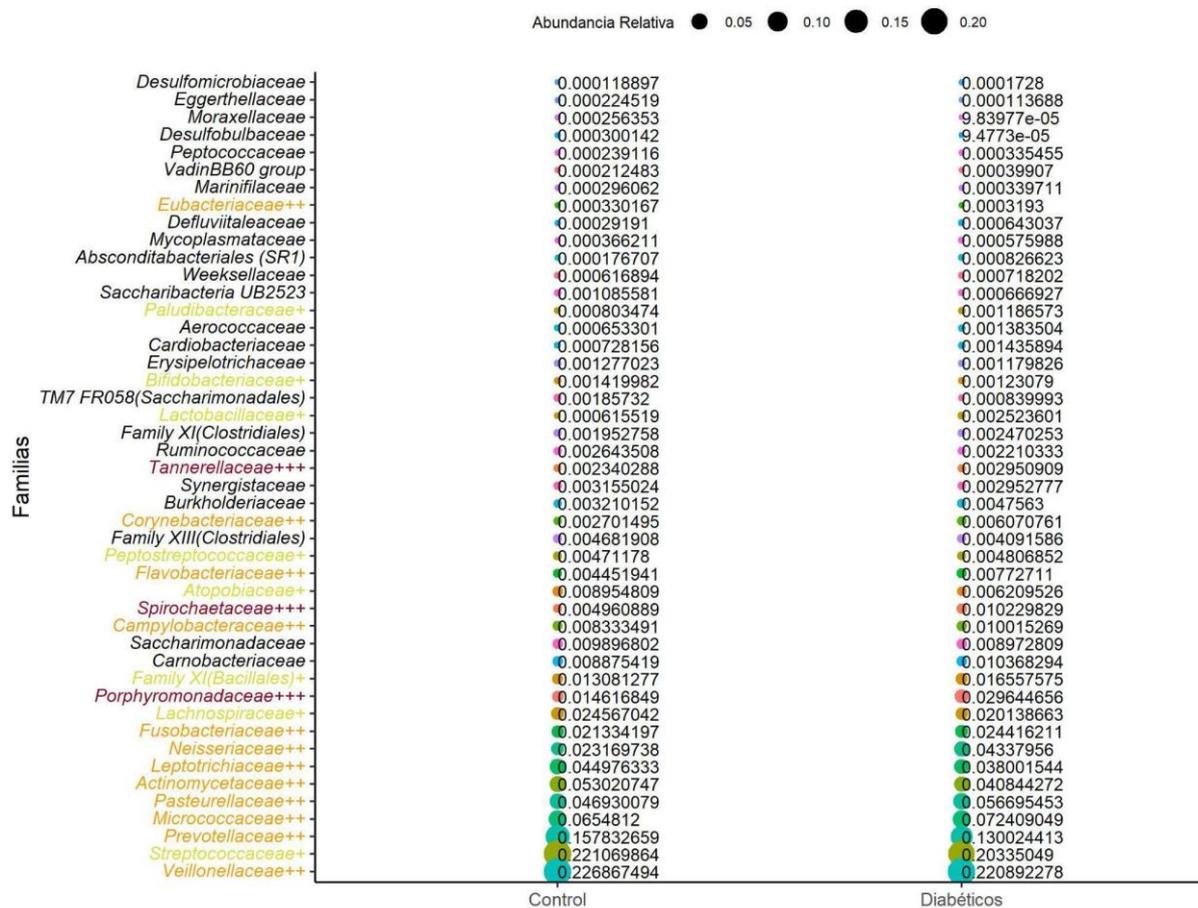
**Figura 6.9.-** (A) Comparación de medias de los índices de diversidad con la prueba de Wilcoxon entre diabéticos y controles. (B) Comparación del promedio de número de OTUs con la prueba de Wilcoxon entre fumadores diabéticos y controles.

La diversidad beta, por otra parte, no presentó un agrupamiento claro con ninguna variable, constituyendo una nube de datos revueltos entre todas las variables, indicando que las variables no tienen ninguna relación apreciable en términos de diversidad (figura 6.10).



**Figura 6.10.-** Análisis de la diversidad beta calculada con el índice Bray-Curtis por PCoA. En azul se muestran los diabéticos y en rojo los controles; los rombos corresponden a mujeres y los cuadros a hombres.

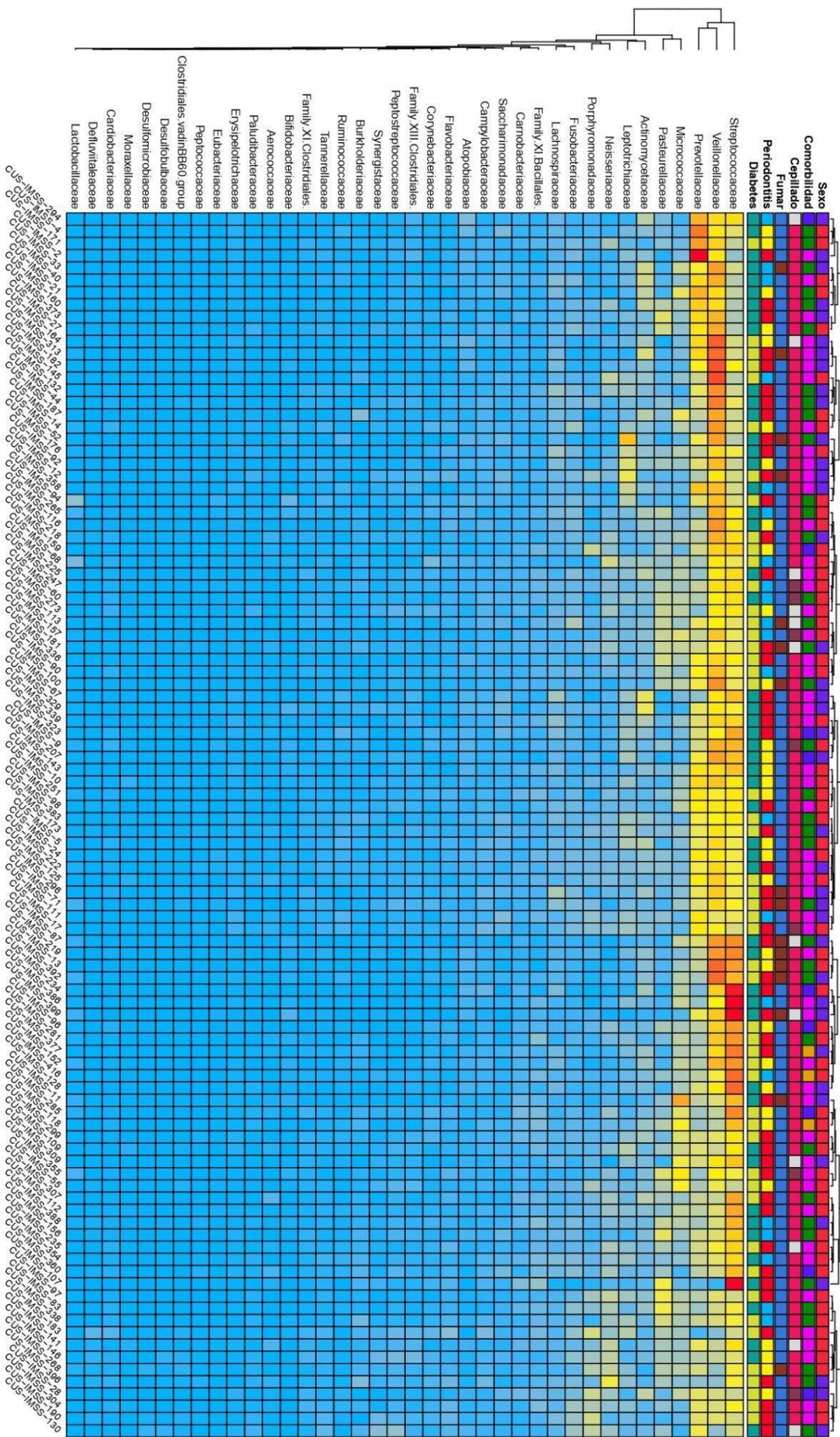
La asignación para determinar a qué taxones pertenecen las secuencias encontradas se logró en 7,747 OTUs (98.9%), los cuales fueron asignados en 15 phylum, de estos 7,518 OTUs (96%) se asignaron a 104 familias, que es el nivel taxonómico en el que se basan los análisis; y solo 2,397 OTUs (30.6%) fueron asignados hasta especie, encontrándose distribuidos en 45 especies. Lo anterior aportó información útil para determinar la composición específica de las muestras, pero no para realizar análisis ecológicos o de valor clínico debido a la variabilidad intra-especie en las bacterias y a la importancia que representan los plásmidos en la biología bacteriana (Janda & Abbott, 2007; Woo *et al.*, 2008). Las familias con la mayor abundancia fueron: Veillonellaceae, Prevotellaceae, y Streptococcaceae (figura 6.11), estas son representantes comunes de la microbiota bucal; también se detectaron familias de importancia en el desarrollo de la periodontitis como son Neisseriaceae, Tannerellaceae, Actinomycetaceae, Porphyromonadaceae, Campylobacteraceae y Fusobacteriaceae (Haffajee *et al.*, 2004; Casarin *et al.*, 2012). En la figura 6.11 se muestran las 46 familias con mayor abundancia (>0.002%)



**Figura 6.11.-** Promedio de abundancia relativa por familia entre diabéticos y controles, únicamente se muestran 46 familias con una abundancia mayor al 0.002% y un registro en el microbioma bucal con base en la bibliografía.

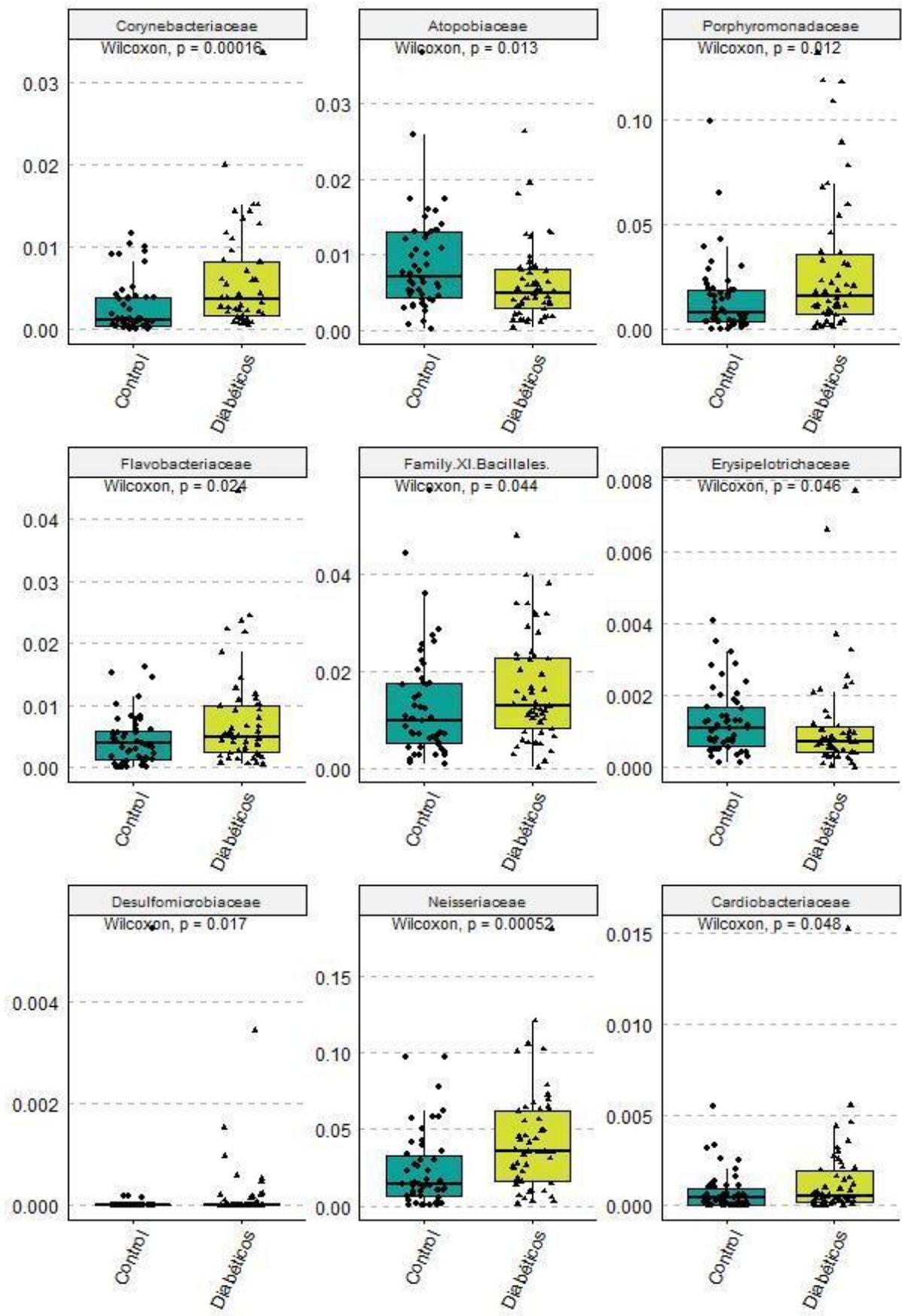
Sabiendo que familias presentaban una mayor abundancia relativa, se buscó conocer la relación que guardaban las variables clínicas con esta abundancia y si existía algún tipo de agrupamiento entre familias y variables clínicas (figura 6.12). Las muestras se agruparon con base en los cambios de abundancia relativa de 9 familias, las cuales podrían estar constituyendo diferentes tipos de

microbiomas, similar a lo descrito en los enterotipos, en los cuales un conjunto específico de ciertos grupos conllevan a características específicas del microbioma (Arumugam *et al.*, 2013). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por el cálculo de la diversidad beta, ya que nuevamente no existió un agrupamiento evidente de las muestras con base en las variables clínicas.



**Figura 6.12.-** Mapa de calor con la abundancia relativa de cada familia por muestra. En la parte superior se muestran las variables observadas, la distancia en las ramas de los dendrogramas se calculó con el método de Ward.

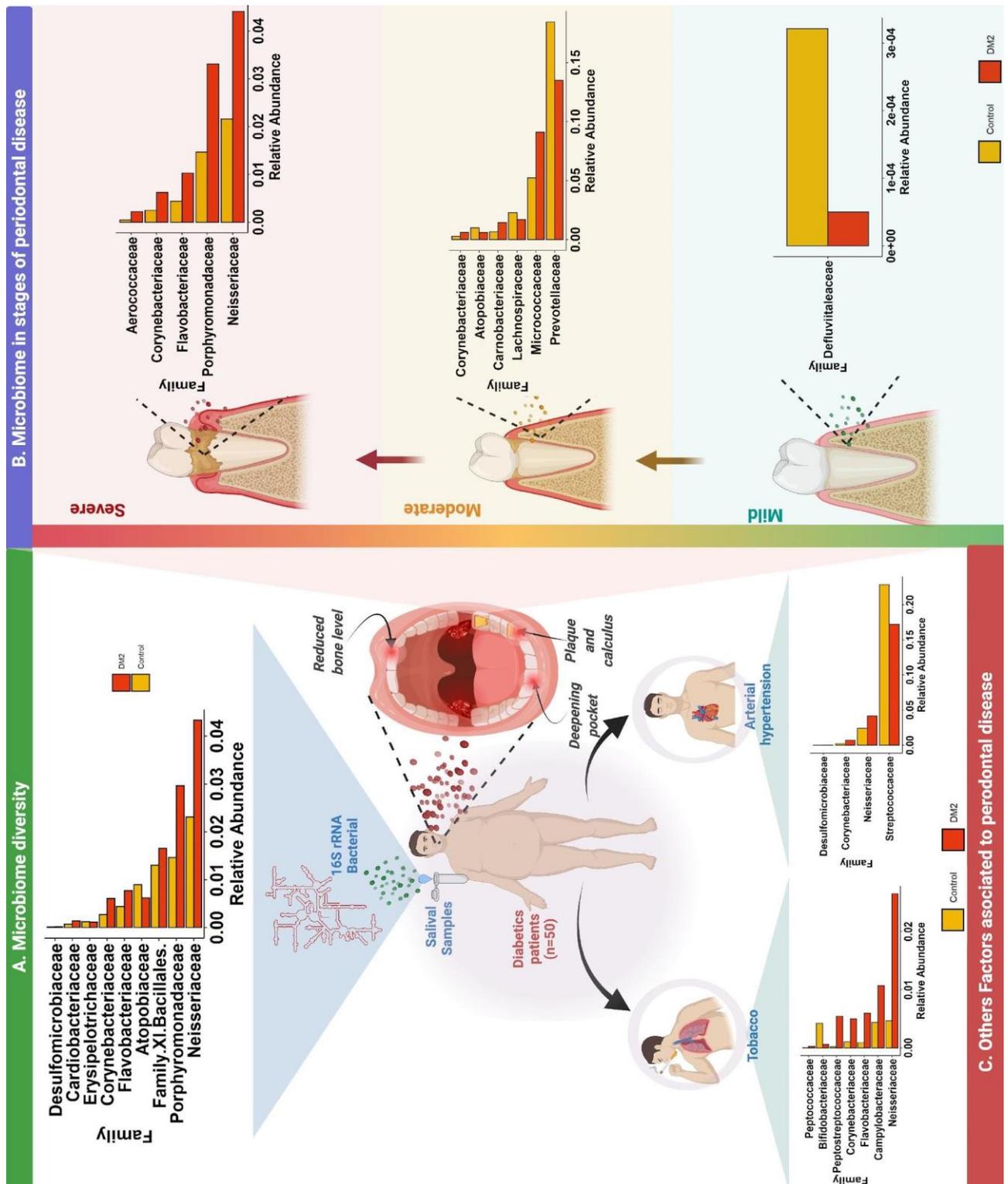
Con el fin de entender si las diferencias en la abundancia relativa de las familias tenían una relación con alguna de las variables del estudio, se hizo una comparación de medias entre diabéticos y controles. Se utilizaron únicamente las 46 familias previamente mencionadas; al realizar esta comparación se obtuvo una diferencia significativa entre la abundancia relativa de 9 familias (Corynebacteriaceae, Porphyromonadaceae, Flavobacteriaceae, family XI (Bacillales), Atopobiaceae, Desulfomicrobiaceae, Neisseriaceae, Cardiobacteriaceae, Erysipelotrichaceae) en diabéticos y controles (figura 6.13). Entre las que destacan Porphyromonadaceae, Corynebacteriaceae y Neisseriaceae por estar relacionadas directamente con la periodontitis.



**Figura 6.13.-** Comparación de medias de la abundancia relativa de familias entre diabéticos y controles, únicamente se muestran aquellas con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

La familia Corynebacteriaceae mostró un aumento en la abundancia relativa en diabéticos, el cual se mantuvo incluso entre variables, en ambos sexos los diabéticos tuvieron una mayor abundancia en comparación con los controles; además, esta familia se presentó en ambos grupos del tabaquismo. Asimismo, en el subgrupo con hipertensión o cepillado 2 a 3 veces al día presentó un aumento de esta familia en diabéticos. El aumento de esta familia se encontró también en los subgrupos con periodontitis moderada y grave, lo que nos podría indicar una relación con el avance de esta enfermedad en diabéticos (figura 6.14, Anexo 6).

En el grupo de diabéticos fumadores se observó un aumento en 6 familias (Corynebacteriaceae, Flavobacteriaceae, Campylobacteraceae, Peptococcaceae, Peptostreptococcaceae y Neisseriaceae), mientras que en los diabéticos no fumadores 4 familias aumentaron (Corynebacteriaceae, Porphyromonadaceae, Neisseriaceae y Cardiobacteriaceae). Bifidobacteriaceae disminuyó en diabéticos fumadores y no fumadores en comparación con controles.



**Figura 6.14.-** Familias con diferencias significativas de diabéticos en comparación con los controles, al centro se muestra la comparación general, en el círculo externo se muestra dividida por variables.

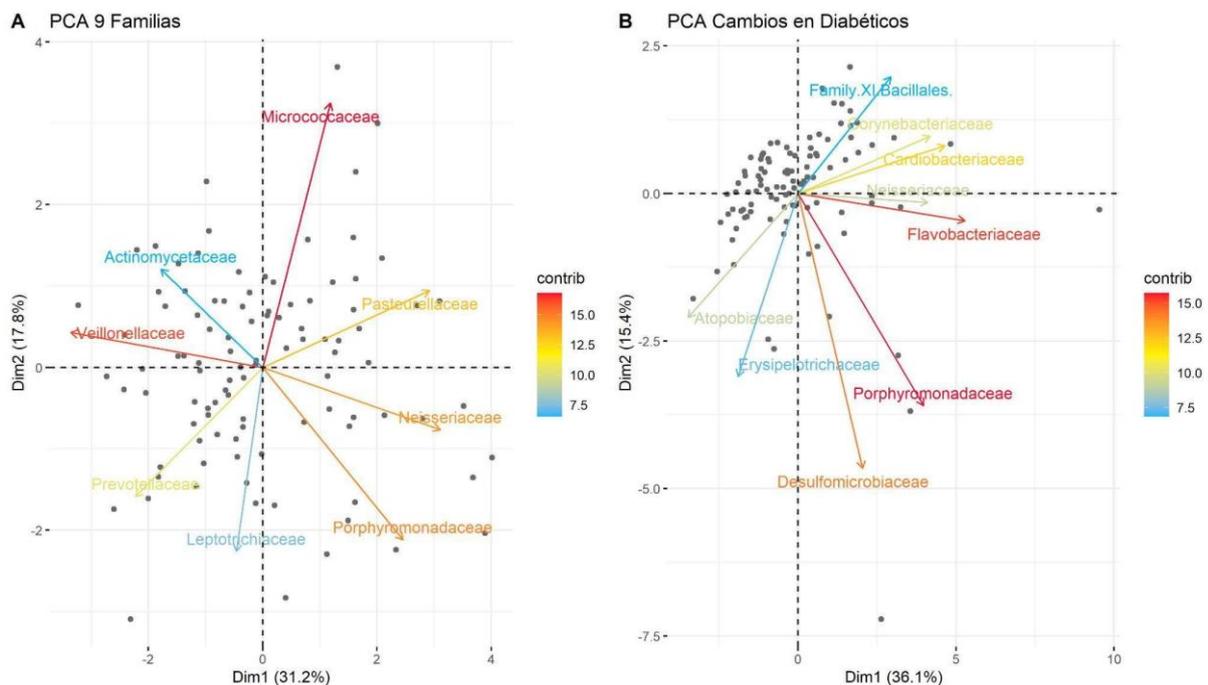
La división por comorbilidades mostró cambios interesantes pues las diferencias entre las familias no son idénticas en el grupo que solo presenta hipertensión en comparación con los que padecen hipertensión y otra enfermedad. Los diabéticos con hipertensión y otro padecimiento presentaron un aumento en la abundancia relativa de 5 familias (figura 6.14). Por su parte los que solo padecen hipertensión tuvieron un aumento en 3 familias y disminución en la familia Streptococcaceae. Finalmente, la familia Actinomycetaceae tuvo menor abundancia relativa en diabéticos sin otra

enfermedad. Los cambios en las familias de acuerdo al padecimiento específico de una u otra enfermedad, además de la diabetes puede indicar que las comorbilidades influyen en la composición del microbioma.

La familia Porphyromonadaceae presentó un aumento en diabéticos en el subgrupo con periodontitis grave, lo cual puede atribuirse al agravamiento de la enfermedad y creación de un microambiente más favorable para esta familia a causa de la diabetes (Howard *et al.*, 2021). Interesantemente, las familias que presentaron aumentos en la abundancia relativa en cada subgrupo de los estados de la periodontitis aumentaron progresivamente. Como se observó en diabéticos con periodontitis moderada, 3 familias tienen un aumento en la abundancia relativa, mientras que en diabéticos con periodontitis grave son 5 familias.

En el grupo con cepillado dos a tres veces al día que es el más común, se encontró un aumento de 4 familias y la disminución de 3. Estos cambios en el microbioma de los diabéticos podrían ser la clave para conocer cómo es que efectivamente algunos grupos bacterianos son beneficiados por el padecimiento de diabetes, e importantemente que a pesar del cuidado bucal la condición sistémica está influyendo en el microbioma bucal.

Finalmente, para bosquejar la relación existente entre todas las familias, su interacción y cómo segregan las variables se realizó un análisis de componentes principales, en el que se observó que algunas familias coaccionan en la varianza de las muestras y que son las familias más influyentes en el microbioma bucal, provocando una mayor contribución a esa varianza como se observa por el color de las flechas (figura 6.15A). Además, las familias con un aumento en diabéticos separan de manera consistente las muestras hacia un mismo lado (figura 6.15B).



**Figura 6.15.-** (A) Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras utilizando la abundancia relativa de las 9 familias que más influyen en el agrupamiento de las muestras de la figura 6.12. (B) Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras utilizando la abundancia de las familias que presentaban diferencias significativas en diabéticos. Las flechas indican la dirección y la contribución a la varianza total de las muestras por cada familia.

## 7. Discusión

Diversos estudios han evaluado la relación entre la periodontitis y la condición diabética, sin embargo, la mayoría se ha centrado en el análisis molecular de esta interacción, dejando de lado el perfil

microbiológico que desempeña un papel fundamental en la periodontitis. Es por ello que el presente estudio se enfocó en observar los cambios en la comunidad bacteriana bucal y establecer las relaciones con otras variables, las cuales están modificando el microbioma bucal, y afectando la relación entre la periodontitis y la diabetes.

A pesar de que México se encuentra en uno de los primeros lugares en el padecimiento de diabetes, con una prevalencia entre el 10% y el 14% de la población adulta (Meza *et al.*, 2015), la recolección de muestras se vio afectada por la cantidad de comorbilidades presentes en la población diabética y el tratamiento consecuencia de estas. El uso de antibióticos fue el principal criterio de exclusión en el estudio, el cual es muy común en diabéticos, si se tiene en cuenta que el riesgo de muerte por infección aumenta entre 3 y 8 veces en comparación con la población no diabética (Alegre-Díaz *et al.*, 2016) y que es una práctica clínica habitual en el tratamiento de la periodontitis (Herrera *et al.*, 2002; Gómez-Sandoval *et al.*, 2020).

La edad en la población diabética en este estudio es consistente con otros reportes de incidencia en la población mexicana, en los cuales la mayoría de casos se agrupan entre los 40 a 80 años y tienen su pico máximo en personas entre 60 y 70 años de edad (fig 6.1), pues se estima que casi el 33% de la población en ese grupo de edad padece diabetes (Meza *et al.*, 2015; Bello-Chavolla *et al.*, 2017); así mismo, con el objetivo de realizar una comparación representativa, la edad en el grupo de controles se pareó para tener una distribución similar, de tal manera que esta no fuese una variable adicional dentro del estudio, pues está bastante documentado que el microbioma bucal cambia con la edad (Takeshita *et al.*, 2016).

La hipertensión es la comorbilidad más común asociada a la diabetes, la coexistencia de estas dos enfermedades es bastante común en la población, siendo una evidencia de la relación bidireccional que existe entre ellas. La diabetes es por sí sola un posible indicador del posterior padecimiento de hipertensión, independientemente de otras variables como el sexo o la edad (Tsimihodimos *et al.*, 2018). Cerca de la mitad de los pacientes diabéticos son hipertensos, una característica que ha sido destacada en varios estudios epidemiológicos de la enfermedad. De igual manera, el padecer ambas enfermedades modifica el estado sistémico, además del estilo de vida de los pacientes, lo cual puede influir en los objetivos de este estudio y generar las diferencias entre ambos grupos (Bello-Chavolla *et al.*, 2017).

El tabaquismo en diabéticos se encuentra posiblemente subrepresentado, siendo que solo el 10% de los pacientes reportó este hábito, a pesar de existir evidencia que señala un mayor porcentaje en la población mexicana diabética, el cual ronda el 15% al 45% dependiendo del sexo (Alegre-Díaz *et al.*, 2016), esto posiblemente porque los pacientes se encuentran en constante monitoreo médico y se les solicita el cambio de estilo de vida para tener un buen control de la diabetes. Sin embargo, a pesar de ser un subgrupo pequeño las diferencias presentes en él son de amplio interés y es necesario profundizar el tema en futuros estudios enfocados en el tabaquismo para poder entender los mecanismos moleculares o bioquímicos que ocasionan cambios en la comunidad bacteriana.

El enriquecimiento de las regiones V3-V4 del gen 16S, fue el paso crucial de este proyecto, por ende con la estandarización de la PCR se buscó obtener el mejor rendimiento, confirmado en las bandas visibles de los geles de agarosa (figura 6.3). Sin embargo la heterogeneidad presente en la visibilidad de las bandas, asumida como la efectividad de enriquecimiento de estas regiones es explicada por la complejidad de las PCR en muestras con mezclas complejas de ADN (Suzuki & Giovannoni, 1996). Para entender mejor las diferencias en la amplificación en este tipo de PCR se deben tener en cuenta varios principios, entre los que destacan que el fragmento de interés debe estar igualmente disponible en todas las muestras, y que existe una mala hibridación de los oligonucleótidos, a causa del uso de *primers* universales (Sipos *et al.*, 2007). Estos principios no pueden ser controlados en su totalidad debido a la naturaleza de las muestras, pues están sujetas a la diferencia de tamaño de los genomas presentes en las muestras, y el número de copias del gen 16S que presenta cada organismo, así como a la presencia de detritos celulares del paciente (Sipos *et al.*, 2007).

A pesar de la evidencia del impacto en la proporción entre el ADN molde y producto que puede ser generada por el número de ciclos en esta PCR (Suzuki & Giovannoni, 1996), el número de ciclos fue modificado, siendo que el manual recomienda 25 y se realizaron a 35 ciclos, dado que en otros estudios

no detectan dicha influencia. Se tomó la decisión de modificar este parámetro con el fin de obtener una mayor eficiencia de amplificación. Adicionalmente, Lueders & Friedrich (2003) confirman el uso de este tipo de PCR con fines cuantitativos al respetar las proporciones originales de las muestras, y que estas no se ven afectadas de manera significativa por el número de ciclos.

Añadir el análisis de diversidad en estudios clínicos que involucren el ámbito microbiológico es cada vez más relevante, dado que el cálculo de distintos índices de diversidad es de mucha ayuda en el estudio de la ecología de comunidades. Su aplicación en el ámbito de la salud ha permitido un mayor entendimiento de los procesos que ocurren durante la patogénesis de las enfermedades al proveer datos cuantitativos de modificaciones del microbioma durante el desarrollo de la enfermedad (Proctor, 2019). Sin embargo, la complejidad del significado de estos índices de diversidad ha sesgado su uso, pues en muchos estudios no encuentran diferencias entre sus grupos o la interpretación que se les da no es la adecuada (Gilbert & Lynch, 2019). Con base en lo anterior, en el presente estudio los análisis de diversidad se utilizaron primordialmente como elementos adicionales para la comparación entre grupos más que como herramientas descriptivas de la comunidad.

La riqueza de las muestras entendida como el número de OTUs observados por muestra fue de 308 OTUs en promedio, similar a otros estudios de microbioma proveniente de saliva, Kawamura & Kamiya (2012), en donde se reportan entre 153 y 401 OTUs por muestra. En términos generales todas las muestras presentaron una elevada diversidad alfa, medida por el índice de Shannon, el cual toma como punto de corte mayor a 3 para definir un microbioma como altamente diverso. Sin embargo, este parámetro requiere una amplia interpretación, tomando en cuenta que la comunidad que se está evaluando presenta disturbios causados por la patogénesis de la periodontitis (Gilbert & Lynch, 2019). Si bien comparar la diversidad alfa de muestras entre distintos estudios no es del todo correcto, y existen reportes que aseveran que varía significativamente al estar sujeta a cambios constantes, un valor alto en la diversidad de Shannon es comúnmente encontrado en diversos estudios que evalúan el microbioma oral, y que varía enormemente según el método, el tipo de muestras o la región del gen evaluada. En términos generales nuestros resultados son consistentes con otros en una elevada diversidad de Shannon. Estudios de saliva reportan una diversidad de Shannon de 4.7 en promedio en personas saludables (Lim, *et al.*, 2017). Por otro lado hay reportes de 3.7 en adultos mayores con caries (Jiang, 2019), sin embargo dicho estudio utilizó muestras de placa dental, las cuales constan de una menor diversidad en comparación con la saliva (Costalonga & Herzberg, 2014). Por otro lado, nuestros resultados son contradictorios con estudios realizados en saliva de diabéticos a lo largo del desarrollo de periodontitis, los cuales reportan un valor de Shannon entre 1.6 y 2.8 (Sabharwal, *et al.*, 2018), a pesar de las semejanzas en el diseño de ambos estudios, esta gran diferencia en términos de diversidad de Shannon puede ser atribuida a la profundidad de secuenciación, ya que en dicho estudio no reportan las lecturas totales por muestra; las cuales tienen un impacto significativo en el número de OTUs observados y por ende en la diversidad. Es por ello que en este trabajo se controló este factor confusor mediante la realización de curvas de rarefacción. En todas las muestras se observó que se alcanzó la fase asintótica, lo cual implica que la profundidad de secuenciación fue adecuada.

Al evaluar el cambio en la diversidad entre los pacientes diabéticos y controles, no hubo diferencias significativas, concordando con otros estudios realizados en adolescentes (Janem, *et al.*, 2017). Sin embargo, en adultos existe una controversia entre si los pacientes diabéticos presentan una mayor diversidad en comparación con normoglucémicos (Casarín *et al.*, 2012); o si la diabetes promueve una disminución en la diversidad bacteriana bucal (Sabharwal, *et al.*, 2018). La falta de consenso entre el efecto de la diabetes en la diversidad bacteriana bucal cuando se evalúa por muestras de saliva recae en las diferencias estructurales de los estudios, siendo que en algunos los pacientes diabéticos se encuentran con niveles controlados de glucosa, y en otros no. Además, el estado metabólico de los pacientes diabéticos es complejo y variable, y puede generar modificaciones dinámicas del microbioma. Finalmente, para lograr el consenso hacen falta más estudios en donde se tengan claras estas variables para lograr una mejor comparación y poder comprender mejor qué sucede, con el microbioma salival, en términos de diversidad cuando se padece diabetes. En conclusión a este respecto, podemos mencionar que la periodontitis ocasiona un aumento en la diversidad bacteriana salival como ya había sido

reportado anteriormente, pero la diabetes tiene un efecto confuso dependiendo el modelo con el cual se haga el estudio ( Lim *et al.*, 2017; Farina *et al.*, 2019).

La confusión generada por los datos de diversidad es lo que hace tan necesario la descripción de la comunidad bacteriana, para poder establecer de manera clara que es lo que ocurre en el microbioma bucal con estos cambios, pues si bien pueden no existir cambios importantes en la diversidad, es decir se encuentran bastantes especies distintas repartidas de manera equitativa, lo cual a grandes rasgos indicaría una buena diversidad, estas especies pueden ser distintas en ambos grupos y ser las directrices para entender el efecto que tiene la diabetes en la periodontitis (Gilbert & Lynch, 2019). En el presente estudio se encontró evidencia que 9 familias tienen un cambio en su abundancia relativa en diabéticos entre las cuales se encuentran, Porphyromonadaceae, Corynebacteriaceae y Neisseriaceae, familias con roles ampliamente descritos tanto en el microbioma oral como en la periodontitis.

La abundancia relativa de la familia Porphyromonadaceae aumentó de manera significativa (0.03 Diab y 0.015 Ctrl,  $p < 0.05$ ), un fenómeno visto anteriormente en otro estudio (Ebersole *et al.*, 2008). No obstante, Casarín *et al.* (2012) encontraron que la abundancia de la familia disminuye en diabéticos, coincidiendo con lo reportado por Sun *et al.* (2020). A pesar de la discrepancia observada en la abundancia de este grupo, cuando se comparan por el padecimiento de la diabetes ambos autores concluyen que sus resultados pueden estar sesgados por el número de muestras ( $n=11/12$ , respectivamente). Entonces, podemos hipotetizar que el aumento encontrado se debe a contar con un mayor tamaño de muestra. Un estudio que es consistente con esta hipótesis es el de Ebersole *et al.* (2008,  $n=39$ ), en donde la abundancia de Porphyromonadaceae aumentó en diabéticos. Por otro lado, estas diferencias en la abundancia del grupo entre diabéticos y controles y las evidencias reportadas por otros autores pueden ser explicadas por el control glicémico de los pacientes, ya que este ha sido asociado a una menor abundancia de *Porphyromonas* en diabéticos con niveles controlados de glucosa (Makiura *et al.* 2008). Además el aumento también se presenta cuando se evalúan los subgrupos, específicamente en el grupo con periodontitis grave el aumento podría indicar la una posible coadyuvancia entre ambas enfermedades, corroborando lo que otros estudios han reportado (Gajardo *et al.*, 2005; Faveri *et al.*, 2009; Bonifacio *et al.* 2011; Heller *et al.* 2012), lo cual sugiere que la diabetes efectivamente contribuye al aumento de bacterias patógenas en el microbioma oral. Interesantemente, el aumento de la familia Porphyromonadaceae observado en el subgrupo de no fumadores y no en el de fumadores es consistente con el estudio de Mager *et al.* (2003), el cual reportó un aumento en este subgrupo en personas no fumadoras en comparación con aquellos que sí lo hacen. El efecto del tabaquismo sobre este grupo bacteriano es interesante y entender el mecanismo bajo el cual recae podría ayudar a entender a mayor profundidad la dinámica entre la comunidad bacteriana y factores exógenos en la fluctuación del microbioma bucal.

La familia Neisseriaceae se asocia a la salud bucal (Takeshita *et al.*, 2014) y aquí encontramos un aumento en diabéticos. La presencia de esta familia en la mayoría de subgrupos es un hallazgo interesante, coincidiendo con reportes previos y siendo potencialmente explicado por el aumento de glucosa sanguínea que actúa como estimulante del crecimiento de ciertos grupos bacterianos en la cavidad bucal, hipótesis que explica parcialmente el aumento de grupos bacterianos asociados a la salud bucal en diabéticos con periodontitis (Casarín *et al.*, 2012; Sabharwal *et al.*, 2019).

El papel de la familia Corynebacteriaceae en la formación de placa dental al estructurar el ambiente y proveer los medios para que otras bacterias colonicen la destacan como una familia de interés para estudiar la progresión de la enfermedad (Welch *et al.*, 2016). El aumento de esta grupo en diabéticos ya ha sido reportado previamente (Sabharwal *et al.*, 2019; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2019), bajo estas características. Una mayor presencia de estas bacterias en los diabéticos indica que están sujetos a una mayor acción de colonización en las superficies dentales y por ende la presencia de periodontitis de manera generalizada en la boca, ya que se ha descrito su asociación con grupos bacterianos representativos de la periodontitis tales como *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Aggregatibacter*, Neisseriaceae, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga*, y *Veillonella* (Mahajan *et al.*, 2013; Welch *et al.*, 2016; Esberg *et al.*, 2020). En conclusión, el aumento de este grupo en diabéticos los

vuelve proclives a un empeoramiento acelerado de la periodontitis y a una transformación dirigida a un microbioma más patógeno.

De forma similar a lo reportado por otros trabajos, la familia Flavobacteriaceae tiene una mayor abundancia en el grupo diabético. Estudios anteriores han reportado este hecho (Casarín *et al.*, 2012; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2019), así mismo es uno de los pocos cuya relación ha sido evaluada. Específicamente el género *Capnocytophaga* ha sido caracterizado por contar con organismos sacarolíticos, los cuales son beneficiados por el aumento de glucosa presente en la diabetes y por tanto propiciando su crecimiento (Spratt *et al.*, 1996). Aunado a este efecto, se han descrito otros mecanismos por los cuales podría la diabetes influenciar la presencia de este grupo, como la falta de especificidad presente en la inmunoglobulina G (IgG) en diabéticos tipo 1 contra las proteínas de estas bacterias (Dyer *et al.*, 1997). Finalmente este aumento en la abundancia también está relacionado al aumento de Corynebacteriaceae, ya que estos dos grupos están ampliamente relacionados, pues *Capnocytophaga* utiliza la forma de crecimiento filamentosa de *Corynebacterium* para establecerse durante la formación del biofilm dental. Por ende, si hay una gran cantidad de sitios para su establecimiento, el crecimiento de estas bacterias será beneficiado (Welch *et al.*, 2016).

La familia Atopobiaceae tiene una disminución en su abundancia en diabéticos, efecto que no había sido previamente descrito, pero es contradictorio con lo reportado por Sabharwal *et al.* (2019), quienes encontraron un aumento del género *Olsenella* en diabéticos. Al no estar descrito de manera general el papel de este grupo bacteriano en la periodontitis es difícil concluir si este cambio pudiese ser generado por la condición diabética o alguna otra característica. De manera similar, los cambios en las familias Desulfomicrobiaceae y Erysipelotrichaceae no habían sido descritos con anterioridad, por lo cual establecer el papel que estas familias tienen en la interacción diabetes-periodontitis es difícil de establecer. En general son grupos poco reportados en este tipo de estudios de microbioma, sin embargo, se especula que el metabolismo del azufre, en el que participa Desulfomicrobiaceae, puede tener un papel en la homeostasis del microbioma bucal (Langendijk *et al.*, 2001). Sin embargo, no hay suficiente información y tienen una abundancia tan baja que los hace pasar desapercibidos en la mayoría de estudios.

En el subgrupo de controles sin comorbilidad que podemos clasificar como totalmente sanos encontramos el aumento de la familia Actinomycetaceae. Este grupo a pesar de ser un colonizador y tener un papel en la formación del biofilm dental, está asociado a proveer una protección contra bacterias patogénicas asociadas a la periodontitis (Benítez-Páez *et al.*, 2014). Por ende puede ser en un futuro un posible indicador del efecto de la diabetes en el microbioma bucal de personas con periodontitis. El entender bajo qué circunstancias se genera esta disminución en la abundancia, puede ayudar a simplificar las vías metabólicas alteradas en el microambiente y suponer las causas y consecuencias que son generadas por la condición diabética. El cambio de este grupo de bacterias es contradictorio con reportes previos que asocian un aumento de *Actinomyces* a la presencia de diabetes (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2019). Esta diferencia puede deberse al tipo de muestra, al estar presentes estas bacterias en la base del biofilm puede dificultar su identificación en saliva (Costalonga & Herzberg, 2014; Welch *et al.*, 2016).

## 8. **Conclusión**

La composición taxonómica del microbioma salival en pacientes mexicanos diabéticos se compone principalmente de 45 familias bacterianas, de las cuales 9 representan la mayoría de la abundancia del total. Asimismo son 9 familias las que presentan un cambio en la abundancia relativa cuando se compara con personas sin diabetes.

Hay elementos para concluir que algunas de las familias que presentan un aumento de abundancia en diabéticos, están ligadas a factores asociados a la enfermedad, lo que nos indica una relación entre la diabetes y la periodontitis vislumbrada por los cambios en el microbioma.

Las variables estudiadas tienen un efecto en la distribución de las diferencias observadas en diabéticos, sin embargo ninguna provoca un patrón específico para ser utilizada de marcador al realizar el

agrupamiento de las muestras. El tabaquismo fue el factor exógeno que causa cambios en la abundancia más evidentes y cuyo estudio debe ser examinado.

### **9. *Perspectivas***

Realizar un estudio con una cohorte mayor de muestras para observar si el tamaño muestral afecta las diferencias observadas en los subgrupos generados por las variables, tal y como se describió en la discusión, con el fin de entender la coacción de factores exógenos y endógenos en microbioma bucal de pacientes diabéticos con periodontitis. Igualmente rediseñar el estudio para realizar una secuenciación completa del microbioma y no solo basada en un gen, esto nos permitiría observar las rutas metabólicas y, por ende, se podrían obtener conclusiones más fundamentadas del efecto de la diabetes en el microbioma.

## 10. Referencias

R

1. A  
legre-Díaz, J., Herrington, W., López-Cervantes, M., Gnatiuc, L., Ramirez, R., Hill, M., Baigent, C., McCarthy, M. I., Lewington, S., Collins, R., Whitlock, G., Tapia-Conyer, R., Peto, R., Kuri-Morales, P., & Emberson, J. R. (2016). Diabetes and Cause-Specific Mortality in Mexico City. *New England Journal of Medicine*, 375(20), 1961–1971. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1605368>
2. A  
llen, E. M., Matthews, J. B., O’Halloran, D. J., Griffiths, H. R., & Chapple, I. L. (2011). Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(10), 894–901. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01764.x>
3. A  
MERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). (2018). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetes 2018. *Diabetes Care*, 41, S13–S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
4. A  
rtese, H. P. C., Foz, A. M., Rabelo, M. D. S., Gomes, G. H., Orlandi, M., Suvan, J., D’Aiuto, F., & Romito, G. A. (2015). Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128344>
5. A  
rumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Zeller, G. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
6. B  
arko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. In *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 32, Issue 1, pp. 9–25). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
7. B  
ascones-Martinez, A., Matesanz-Perez, P., Escribano-Bermejo, M., González-Moles, M. Á., Bascones-Ilundain, J., & Meurman, J. H. (2011). Periodontal disease and diabetes-Review of the literature. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 16(6), 722–729. <https://doi.org/10.4317/medoral.17032>
8. B  
ello-Chavolla, O. Y., Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C. A., & Hernández-Avila, M. (2017). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutrition Reviews*, 75, 4–12. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw030>
9. B  
elstrøm, D. (2020). The salivary microbiota in health and disease. In *Journal of Oral Microbiology* (Vol. 12, Issue 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1723975>
10. B  
enítez-Páez, A., Belda-Ferre, P., Simón-Soro, A., & Mira, A. (2014). Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-311>
11. B  
lakytny, R., Spraul, M., & Jude, E. B. (2011). The diabetic bone: A cellular and molecular perspective.

12. B  
olyen, 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., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
13. B  
onifácio, J. D., Aquino, D. R., Franco, G. C. N., Cortelli, S. C., Cogo, K., Guimarães dos Santos, J., Costa, F. O., & Cortelli, J. R. (2011). Prevalence of periodontopathogens in a black Brazilian secluded community matched with a black urban population. *Community Dental Health*, 28(4), 301–304. [https://doi.org/10.1922/CDH\\_2592Cogo04](https://doi.org/10.1922/CDH_2592Cogo04)
14. C  
asarin, R. C. V., Barbagallo, A., Meulman, T., Santos, V. R., Sallum, E. A., Nociti, F. H., Duarte, P. M., Casati, M. Z., & Gonçalves, R. B. (2012a). Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH*, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x>
15. C  
asarin, R. C. V., Barbagallo, A., Meulman, T., Santos, V. R., Sallum, E. A., Nociti, F. H., Duarte, P. M., Casati, M. Z., & Gonçalves, R. B. (2012b). Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x>
16. C  
hang, P. C., & Lim, L. P. (2012). Interrelationships of periodontitis and diabetes: A review of the current literature. *Journal of Dental Sciences*, 7(3), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2012.02.002>
17. C  
hen, L., Wei, B., Li, J., Liu, F., Xuan, D., Xie, B., & Zhang, J. (2010). Association of Periodontal Parameters With Metabolic Level and Systemic Inflammatory Markers in Patients With Type 2 Diabetes. *Journal of Periodontology*, 81(3), 364–371. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090544>
18. C  
iantar, M., Gilthorpe, M. S., Hurel, S. J., Newman, H. N., Wilson, M., & Spratt, D. A. (2005). *Capnocytophaga* spp. in Periodontitis Patients Manifesting Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology*, 76(2), 194–203. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.2.194>
19. C  
ontreras, A., Moreno, S. M., Jaramillo, A., Pelaez, M., Duque, A., & Botero, J. E. (2015). Periodontal microbiology in Latin America.
20. C  
ostalunga, M., & Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
21. C  
uevas-Córdoba, B., & Santiago-García, J. (2014). Saliva: A fluid of study for OMICS. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 18(2), 87–97. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0064>
22. C  
urtis, Way, M. M., & Sing, S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial

and fungal pathogens. *Immunology*, 126(2), 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x>

23. D  
avidson, R. M., & Epperson, L. E. (2018). Microbiome sequencing methods for studying human diseases. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1706, pp. 77–90). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_5)

24. D  
emmer, R. T., Desvarieux, M., Holtfreter, B., Jacobs, D. R., Wallaschofski, H., Nauck, M., Völzke, H., & Kocher, T. (2010). Periodontal status and A1C change: Longitudinal results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Diabetes Care*, 33(5), 1037–1043. <https://doi.org/10.2337/dc09-1778>

25. D  
ewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>

26. D  
yer, J. K., Peck, M. A., Reinhardt, R. A., Duckworth, W. C., Booth, S. J., Seymour, G. J., & Patil, K. D. (1997). HLA-D types and serum IgG responses to capnocytophaga in diabetes and periodontitis. *Journal of Dental Research*, 76(12), 1825–1832. <https://doi.org/10.1177/00220345970760120401>

27. E  
bersole, J. L., Holt, S. C., Hansard, R., & Novak, M. J. (2008). Microbiologic and Immunologic Characteristics of Periodontal Disease in Hispanic Americans With Type 2 Diabetes. *Journal of Periodontology*, 79(4), 637–646. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070455>

28. E  
sberg, A., Barone, A., Eriksson, L., Holgerson, P. L., Teneberg, S., & Johansson, I. (2020). *Corynebacterium matruchotii* demography and adhesion determinants in the oral cavity of healthy individuals. *Microorganisms*, 8(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111780>

29. F  
arina, R., Severi, M., Carrieri, A., Miotto, E., Sabbioni, S., Trombelli, L., & Scapoli, C. (2019). Whole metagenomic shotgun sequencing of the subgingival microbiome of diabetics and non-diabetics with different periodontal conditions. *Archives of Oral Biology*, 104(May), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.025>

30. F  
averi, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Mestnik, M. J., Mayer, M. P. A., & Feres, M. (2009). Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(9), 739–749. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01449.x>

31. F  
EDERACIÓN INTERNACIONAL DE DIABETES (IDF). (2019). *ATLAS DE LA DIABETES DE LA FID* (9th ed.). <https://www.idf.org/e-library/welcome/copyright-permission.html>

32. F  
EDERACIÓN INTERNACIONAL DE DIABETES, (IDF). (2021). *IDF DIABETES ATLAS*. In *Diabetes Research and Clinical Practice* (10th ed.). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.013>

33. F  
ield, C. A., Gidley, M. D., Preshaw, P. M., & Jakubovics, N. (2012). Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *Journal of Periodontal Research*, 47(4), 470–478. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x>

34. G  
 ajardo, M., Silva, N., Gómez, L., León, R., Parra, B., Contreras, A., & Gamonal, J. (2005). Prevalence of Periodontopathic Bacteria in Aggressive Periodontitis Patients in a Chilean Population. *Journal of Periodontology*, 76(2), 289–294. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.2.289>
35. G  
 arbieri, T. F., Brozoski, D. T., Dionísio, T. J., Santos, C. F., & Neves, L. T. das. (2017). Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *Journal of Applied Oral Science*, 25(2), 147–158. <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0046>
36. G  
 enco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F., & Murayama, Y. (2005). A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *Definitions*, November, 2075–2084. <https://doi.org/10.32388/kpegql>
37. G  
 ilbert, J. A., & Lynch, S. V. (2019). Community ecology as a framework for human microbiome research. *Nature Medicine*, 25(6), 884–889. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0464-9>
38. G  
 ómez-Sandoval, J. R., Robles-Cervantes, J. A., Hernández-González, S. O., Espinel-Bermudez, M. C., Mariaud-Schmidt, R., Martínez-Rodríguez, V., Morgado-Castillo, K. C., & Mercado-Sesma, A. R. (2020). Efficacy of clindamycin compared with amoxicillin-metronidazole after a 7-day regimen in the treatment of periodontitis in patients with diabetes: A randomized clinical trial. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000665>
39. G  
 raves, D. T., Fine, D., Teng, Y. T. A., Van Dyke, T. E., & Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(2), 89–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x>
40. G  
 urav, A. N. (2012). Periodontitis and insulin resistance: Casual or causal relationship? In *Diabetes and Metabolism Journal* (Vol. 36, Issue 6, pp. 404–411). <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.6.404>
41. H  
 affajee, A. D., Uzel, N. G., Arguello, E. I., Torresyap, G., Guerrero, D. M., & Socransky, S. S. (2004). Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat “refractory” periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(10), 869–877. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00573.x>
42. H  
 annon, G. J. (2010). FASTX-Toolkit.
43. H  
 eller, D., Silva-Boghossian, C. M. I., Do Souto, R. M., & Colombo, A. P. V. (2012). Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Archives of Oral Biology*, 57(7), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.003>
44. H  
 errera, D., Figuero, E., Shapira, L., Jin, L., & Sanz, M. (2018). La nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Revista Científica de La Sociedad Española de Periodoncia*, 4(11), 94–110.
45. H  
 errera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I., & Roldán, S. (2002). A systematic review on the effect

of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(SUPPL. 3), 136–159. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.29.s3.8.x>

46. H  
oward, K. C., Gonzalez, O. A., & Garneau-Tsodikova, S. (2021). Porphyromonas gingivalis: Where do we stand in our battle against this oral pathogen? *RSC Medicinal Chemistry*, 12(5), 666–704. <https://doi.org/10.1039/d0md00424c>
47. H  
uman Microbiome Project (HMP). (2018). About the Human Microbiome. <https://hmpdacc.org/hmp/overview/>
48. I  
acopino, A. M., & Cutler, C. W. (2000). Pathophysiological Relationships Between Periodontitis and Systemic Disease: Recent Concepts Involving Serum Lipids. *Journal of Periodontology*, 71(8), 1375–1384. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.8.1375>
49. I  
nstituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2021). Estadísticas a propósito del día mundial de la Diabetes (14 de noviembre). Datos nacionales. In Comunicado de Prensa. No. 645/21. <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-diabetes-2020>
50. J  
anda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
51. J  
anem, W. F., Scannapieco, F. A., Sabharwal, A., Tsompana, M., Berman, H. A., Haase, E. M., Miecznikowski, J. C., & Mastrandrea, L. D. (2017). Salivary inflammatory markers and microbiome in normoglycemic lean and obese children compared to obese children with type 2 diabetes. *PLoS ONE*, 12(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172647>
52. J  
iang, Q., Liu, J., Chen, L., Gan, N., & Yang, D. (2019). The oral microbiome in the elderly with dental caries and health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JAN). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00442>
53. K  
atevatis, C., Fan, A., & Klapperich, C. M. (2017). Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PLoS ONE*, 12(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
54. K  
awamura, Y., & Kamiya, Y. (2012). Metagenomic analysis permitting identification of the minority bacterial populations in the oral microbiota. *Journal of Oral Biosciences*, 54(3), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.job.2012.05.002>
55. K  
inane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
56. K  
night, R., Vrbancac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., ... Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 7, pp. 410–422). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>

57. L  
angendijk, P. S., Kulik, E. M., Sandmeier, H., Meyer, J., & van der Hoeven, J. S. (2001). Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1035–1044. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1035>
58. L  
i, H., Yang, H., Ding, Y., Aprecio, R., Zhang, W., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* does not alter the onset or severity of diabetes in mice. *Journal of Periodontal Research*, 48(5), 582–590. <https://doi.org/10.1111/jre.12041>
59. L  
im, Y., Totsika, M., Morrison, M., & Punyadeera, C. (2017). The saliva microbiome profiles are minimally affected by collection method or DNA extraction protocols. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07885-3>
60. L  
u, H., Kraut, D., Gerstenfeld, L. C., & Graves, D. T. (2003). Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 144(1), 346–352. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220072>
61. L  
ueders, T., & Friedrich, M. W. (2003). Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 320–326. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.320-326.2003>
62. M  
ager, D. L., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2003). Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(12), 1031–1037. <https://doi.org/10.1046/j.0303-6979.2003.00418.x>
63. M  
ahajan, A., Singh, B., Kashyap, D., Kumar, A., & Mahajan, P. (2013). Interspecies communication and periodontal disease. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/765434>
64. M  
akiura, N., Ojima, M., Kou, Y., Furuta, N., Okahashi, N., Shizukuishi, S., & Amano, A. (2008). Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, 348–351. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00522.x>
65. M  
ealey, B. L., & Oates, T. W. (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 77(8), 1289–1303. <https://doi.org/10.4103/2349-5006.135022>
66. M  
eza, R., Barrientos-Gutierrez, T., Rojas-Martinez, R., Reynoso-Noverón, N., Palacio-Mejia, L. S., Lazcano-Ponce, E., & Hernández-Ávila, M. (2015). Burden of type 2 diabetes in Mexico: Past, current and future prevalence and incidence rates. *Preventive Medicine*, 81, 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2015.10.015>
67. N  
elson, R. G., Shlossman, M., Budding, L. M., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Genco, R. J., & Knowler, W. C. (1990). Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*, 13(8), 836–840. <https://doi.org/10.2337/diacare.13.8.836>

68. N  
ewman, M. G., Takei, H. H., & Carranza, F. A. (Eds.). (2004). *Carranza's Clinical Periodontology* (9th ed.). W B Saunders Co. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
69. P  
apapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(March), S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
70. P  
etersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 127, S1–S7. <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>
71. P  
olak, D., & Shapira, L. (2018). An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(2), 150–166. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12803>
72. P  
opa, C., Netea, M. G., Van Riel, P. L. C. M., Van Der Meer, J. W. M., & Stalenhoef, A. F. H. (2007). The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, 48(4), 751–752. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600021-JLR200>
73. P  
osner, B. I. (2017). Insulin Signaling: The Inside Story. In *Canadian Journal of Diabetes* (Vol. 41, Issue 1, pp. 108–113). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2016.07.002>
74. P  
roctor, L. (2017). What's next for the human microbiome? *Nature*, 569, 623.
75. R  
ajagopala, S. V., Vashee, S., Oldfield, L. M., Suzuki, Y., Venter, J. C., Telenti, A., & Nelson, K. E. (2017). The human microbiome and cancer. In *Cancer Prevention Research* (Vol. 10, Issue 4, pp. 226–234). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0249>
76. R  
odríguez-Hernández, A. P., Márquez-Corona, M. de L., Pontigo-Loyola, A. P., Medina-Solís, C. E., & Ximenez-Fyvie, L. A. (2019). Subgingival microbiota of mexicans with type 2 diabetes with different periodontal and metabolic conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(17). <https://doi.org/10.3390/ijerph16173184>
77. S  
abharwal, A., Ganley, K., Miecznikowski, J. C., Haase, E. M., Barnes, V., & Scannapieco, F. A. (2019). The salivary microbiome of diabetic and non-diabetic adults with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 90(1), 26–34. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0167>
78. S  
aremi, A., Nelson, R. G., Tulloch-Reid, M., Hanson, R. L., Sievers, M. L., Taylor, G. W., Shlossman, M., Bennett, P. H., Genco, R., & Knowler, W. C. (2005). Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(1), 27–32. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.1.27>

79. S  
hlossman, M., Knowler, W. C., Pettitt, D. J., & Genco, R. J. (1990). Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of the American Dental Association* (1939), 121(4), 532–536. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1990.0211>
80. S  
ipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., & Nikolausz, M. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2), 341–350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x>
81. S  
pratt, D. A., Greenman, J., & Schaffer, A. G. (1996). *Capnocytophaga gingivalis*: effects of glucose concentration on growth and hydrolytic enzyme production. *Microbiology*, 142, 2161–2164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.1999.140208.x>
82. S  
un, X., Li, M., Xia, L., Fang, Z., Yu, S., Gao, J., Feng, Q., & Yang, P. (2020). Alteration of salivary microbiome in periodontitis with or without type-2 diabetes mellitus and metformin treatment. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72035-1>
83. S  
uzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 625–630. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.625-630.1996>
84. T  
akeshita, T., Kageyama, S., Furuta, M., Tsuboi, H., Takeuchi, K., Shibata, Y., Shimazaki, Y., Akifusa, S., Ninomiya, T., Kiyohara, Y., & Yamashita, Y. (2016). Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: The Hisayama Study. *Scientific Reports*, 6(February), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22164>
85. T  
hevis, M., Thomas, A., & Schänzer, W. (2010). Insulin. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 195, pp. 209–226). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_10)
86. T  
omas, C. C., & Philipson, L. H. (2015). Update on Diabetes Classification. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 99, Issue 1, pp. 1–16). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.015>
87. T  
imonen, P., Suominen-Taipale, L., Jula, A., Niskanen, M., Knuuttila, M., & Ylöstalo, P. (2011). Insulin sensitivity and periodontal infection in a non-diabetic, non-smoking adult population. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01642.x>
88. T  
onetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89(January), S159–S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
89. T  
simihodimos, V., Gonzalez-Villalpando, C., Meigs, J. B., & Ferrannini, E. (2018). Hypertension and Diabetes Mellitus Coprediction and Time Trajectories. *Hypertension*, 71(3), 422–428. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10546>

90. V  
 argas Casillas, A. P., Yáñez Ocampo, B. R., & Monteagudo Arrieta, C. A. (2016). *Periodontología e Implantología* (1st ed.). Panamericana.
91. V  
 erma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. In *Archives of Microbiology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 525–540). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
92. W  
 ade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. In *Pharmacological Research* (Vol. 69, Issue 1, pp. 137–143). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
93. W  
 atanabe, K., Petro, B. J., Shlimon, A. E., & Unterman, T. G. (2008). Effect of Periodontitis on Insulin Resistance and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Journal of Periodontology*, 79(7), 1208–1216. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070605>
94. W  
 elch, J. L. M., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(6), E791–E800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113>
95. Y  
 ilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
96. Z  
 hou, M., Rong, R., Munro, D., Zhu, C., Gao, X., Zhang, Q., & Dong, Q. (2013). Investigation of the Effect of Type 2 Diabetes Mellitus on Subgingival Plaque Microbiota by High-Throughput 16S rDNA Pyrosequencing. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061516>

## 11. Anexos

### Anexo I

El nivel de calidad Phred o Q, se define como una propiedad que está relacionada logarítmicamente con las probabilidades de error de las llamadas de base (P).

$$Q = -10 \log_{10} P \quad \text{ó} \quad P = 10^{\frac{-Q}{10}}$$

Ejemplos de niveles de calidad y su relación logarítmica a las probabilidades de error de la base

Nivel de calidad Phred	Probabilidad de factor de error de base	Precisión de que la base sea correctamente nombrada
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1000	99,9%
40	1 en 10.000	99,99%
50	1 en 100.000	99,999%
60	1 en 1.000.000	99,9999%

Anexo 2

Sampl eID	Pe so	Altu ra	IM C	ED AD	GENE RO	DIABE TES	OTRA ENFERMEDAD	FUMAD ORES	ETAPA PERIODO NTAL	CEPILL ADO
CUS- IMSS- 10	83	1.54	35. 00	55	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERA DA	3
CUS- IMSS- 100	62	1.72	20. 96	37	Homb re	Diabéti cos	NO	SI	MODERA DA	3
CUS- IMSS- 107	-	-	-	50	Homb re	Control es	NO	NO	AVANZAD A	3
CUS- IMSS- 109	-	-	-	30	Mujer	Control es	NO	NO	AVANZAD A	2
CUS- IMSS- 111	-	-	-	54	Homb re	Control es	HIPERTENSIÓN	SI	AVANZAD A	2
CUS- IMSS- 111	-	-	-	73	Homb re	Diabéti cos	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	2 A 3
CUS- IMSS- 112	60	1.5	26. 67	81	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZAD A	2
CUS- IMSS- 113	-	-	-	66	Mujer	Diabéti cos	NO	SI	LEVE	1
CUS- IMSS- 116	-	-	-	65	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERA DA	2
CUS- IMSS- 118	-	-	-	57	Mujer	Diabéti cos	HIPOTIROIDISMO	NO	MODERA DA	2 A 3
CUS- IMSS- 12	-	-	-	50	Homb re	Diabéti cos	HIPERTENSIÓN	SI	AVANZAD A	2
CUS- IMSS- 125	-	-	-	55	Mujer	Diabéti cos	HIPERTENSIÓN	NO	MODERA DA	3
CUS- IMSS- 128	-	-	-	64	Homb re	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERA DA	2
CUS- IMSS- 13	76	1.59	30. 06	64	Mujer	Diabéti cos	NO	SI	MODERA DA	2
CUS- IMSS- 130	-	-	-	74	Homb re	Control es	NO	NO	AVANZAD A	CADA TERCE R DÍA
CUS- IMSS- 132	64	1.58	25. 64	74	Homb re	Control es	NO	NO	AVANZAD A	3

CUS-IMSS-14	64	1.55	26.64	58	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-141	75	1.52	32.46	42	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	1
CUS-IMSS-143	90	1.48	41.09	72	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-145	65	1.52	28.13	50	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-146	63	1.53	26.91	54	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-152	67	1.55	27.89	57	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-156	-	-	-	35	Mujer	Control es	NO	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-157	-	-	-	63	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	3 A 4
CUS-IMSS-159	-	-	-	63	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN/VARICES	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-160	-	-	-	35	Hombre	Control es	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-164	-	-	-	86	Hombre	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	1
CUS-IMSS-17	68	1.56	27.94	57	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3 A 4
CUS-IMSS-171	-	-	-	35	Mujer	Diabéticos	NO	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-173	-	-	-	63	Hombre	Diabéticos	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-176	-	-	-	70	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-181	-	-	-	42	Hombre	Diabéticos	NO	SI	AVANZADA	1
CUS-IMSS-182	-	-	-	68	Hombre	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-183	-	-	-	72	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3

CUS-IMSS-187	67	1.49	30.18	50	Mujer	Control es	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-190	84	1.72	28.39	73	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-2	-	-	-	51	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-207	-	-	-	59	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN/COLESTEROL Y TRIG	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-21	62	1.49	27.93	65	Mujer	Control es	NO	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-218	-	-	-	68	Hombre	Diabéticos	NO	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-219	-	-	-	64	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	SI	MODERADA	3
CUS-IMSS-222	-	-	-	66	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-225	-	-	-	62	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	1
CUS-IMSS-234	-	-	-	70	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN/INSUFICIENCIA RENAL	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-235	-	-	-	65	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	1
CUS-IMSS-24	73	1.55	30.39	72	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-247	-	-	-	59	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	4
CUS-IMSS-251	61	1.49	27.48	65	Mujer	Diabéticos	NO	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-265	75	1.52	32.46	55	Mujer	Control es	NO	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-268	66	1.7	22.84	61	Mujer	Diabéticos	NO	SI	MODERADA	2
CUS-IMSS-27	74.5	1.62	28.39	69	Mujer	Control es	NO	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-273	74	1.56	30.41	49	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	1

CUS-IMSS-28	87	1.8	26.85	76	Hombre	Diabéticos	HIPERTENSIÓN/IAM	NO	MODERADA	4
CUS-IMSS-281	-	-	-	60	Mujer	Diabéticos	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-285	-	-	-	75	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN/COLESTEROL Y TRIG	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-294	-	-	-	67	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN/ASMA	NO	LEVE	1
CUS-IMSS-296	-	-	-	68	Hombre	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	SI	AVANZADA	2
CUS-IMSS-299	-	-	-	83	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-304	-	-	-	68	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-307	73.5	1.59	29.07	47	Mujer	Diabéticos	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-309	107	1.72	36.17	71	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	1
CUS-IMSS-313	86	1.72	29.07	62	Hombre	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	SI	AVANZADA	2
CUS-IMSS-323	52	1.5	23.11	75	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN/IAM	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-329	66	1.52	28.57	83	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-33	56	1.6	21.88	32	Hombre	Control es	NO	SI	LEVE	3
CUS-IMSS-336	69.5	1.57	28.20	76	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-338	-	-	-	47	Mujer	Diabéticos	NO	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-339	83	1.62	31.63	63	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-354	-	-	-	53	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	3
CUS-IMSS-355	-	-	-	65	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	5

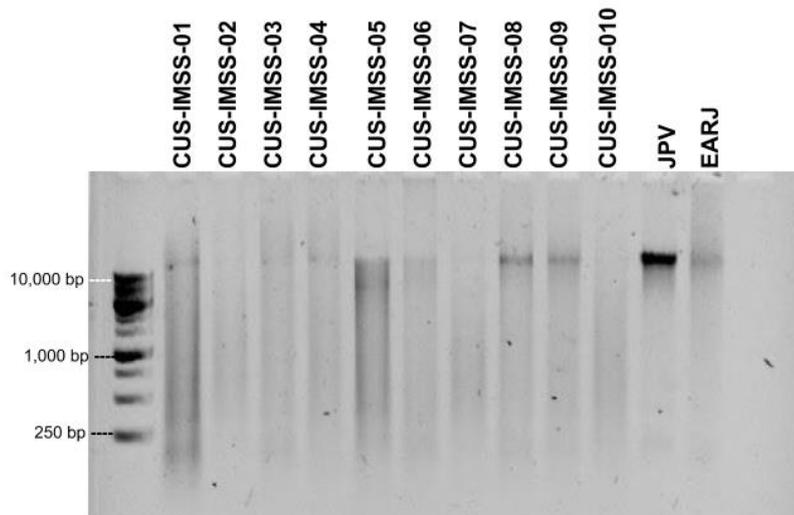
CUS-IMSS-358	-	-	-	44	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-360	-	-	-	54	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN/INSUFICIENCIA RENAL	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-373	68	1.65	24.98	76	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-377	92	1.67	32.99	67	Hombre	Diabéticos	COLESTEROL Y TRIG	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-383	-	-	-	70	Mujer	Diabéticos	NO	NO	LEVE	3
CUS-IMSS-386	-	-	-	83	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	3
CUS-IMSS-388	-	-	-	47	Hombre	Control es	NO	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-392	-	-	-	57	Hombre	Diabéticos	NO	SI	AVANZADA	2
CUS-IMSS-396	-	-	-	55	Hombre	Diabéticos	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-399	-	-	-	62	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	SI	AVANZADA	0
CUS-IMSS-4	-	-	-	34	Mujer	Control es	NO	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-40	75	1.77	23.94	70	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-416	-	-	-	58	Mujer	Diabéticos	COLESTEROL Y TRIG	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-44	64	1.68	22.68	69	Hombre	Control es	NO	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-5	65	1.54	27.41	45	Mujer	Control es	NO	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-52	71	1.71	24.28	63	Hombre	Control es	NO	SI	AVANZADA	2
CUS-IMSS-55	74	1.45	35.20	64	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	3
CUS-IMSS-60	60	1.45	28.54	35	Mujer	Control es	NO	NO	LEVE	3 A 4

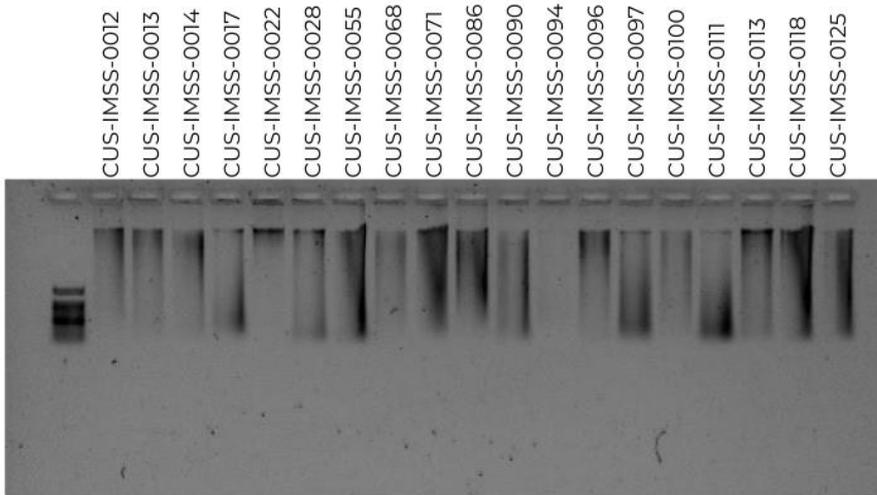
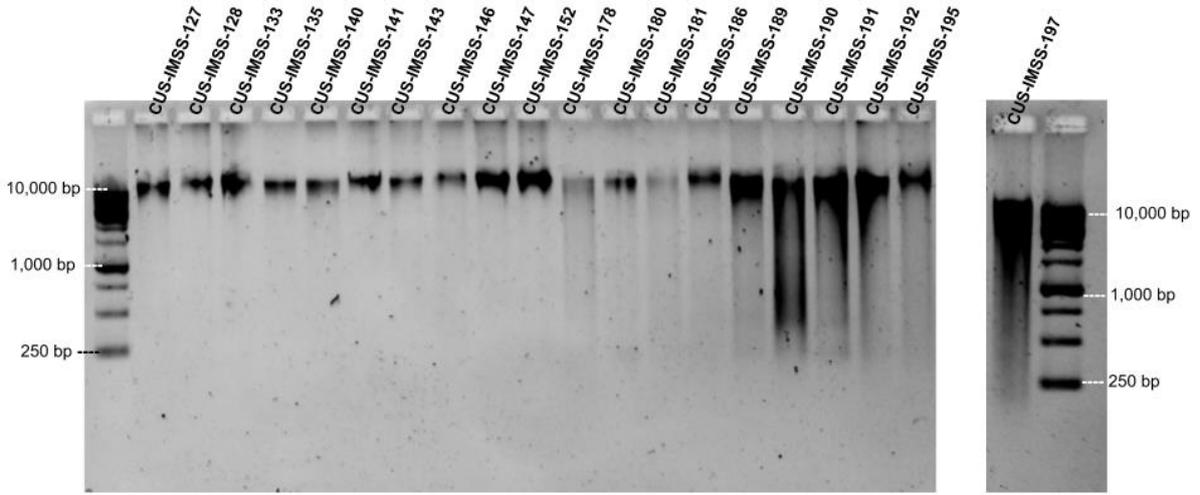
CUS-IMSS-67	-	-	-	59	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-68	53	1.48	24.20	72	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-71	61	1.58	24.44	59	Hombre	Diabéticos	NO	SI	AVANZADA	3
CUS-IMSS-83	59	1.5	26.22	46	Mujer	Control es	NO	NO	LEVE	2
CUS-IMSS-87	65	1.86	18.79	62	Hombre	Control es	NO	SI	AVANZADA	1 A 2
CUS-IMSS-9	65.5	1.46	30.73	54	Mujer	Control es	NO	NO	MODERADA	3 A 4
CUS-IMSS-90	-	-	-	66	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	LEVE	3
CUS-IMSS-92	-	-	-	72	Hombre	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-94	-	-	-	49	Mujer	Diabéticos	NO	NO	AVANZADA	2
CUS-IMSS-96	-	-	-	73	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN/GAS TRITIS	NO	MODERADA	2
CUS-IMSS-97	72	1.56	29.59	60	Mujer	Diabéticos	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	3
CUS-IMSS-98	-	-	-	56	Mujer	Control es	HIPERTENSIÓN	NO	AVANZADA	2

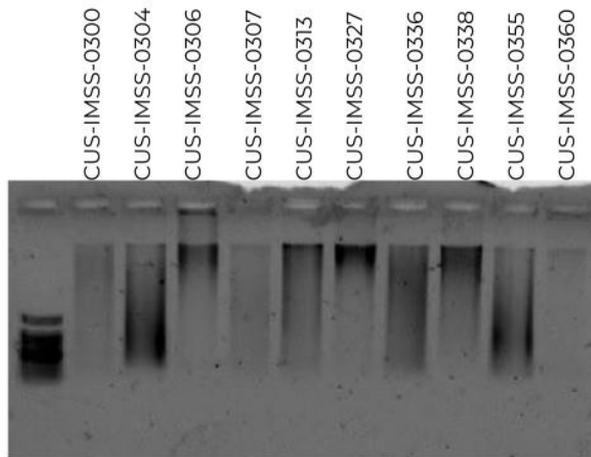
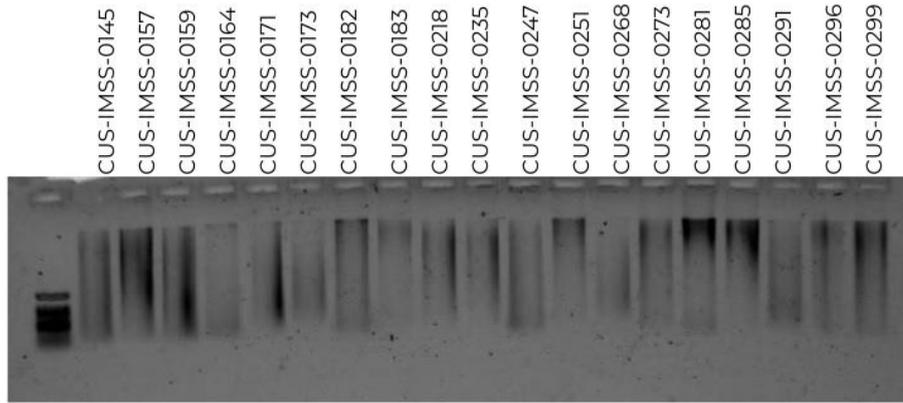
# Anexo 3.1.- GELES DE INTEGRIDAD DNA

Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, revelados por exposición a luz UV, el marcador de peso molecular va de 250 bp a 10,000 bp de abajo hacia arriba.

## Integridad del gDNA Saliva







### Anexo 3.2 Concentración y rendimiento del DNA en cada etapa de la preparación de bibliotecas

Muestras		Extracción DNA		Amplificación PCR		Barcodes		Bibliotecas		Ecuilización bibliotecas			Notas	
No. Consecutivo de muestra	ID	Conc. Quibit (ng/uL)	Rendimiento o gDNA (ng)	Conc. Quibit (ng/uL)	Rendimiento post-PCR (ng)	i5	i7	Etiquetas	Conc. Quibit (ng/uL)	Rendimiento (ng)	Tamaño promedio (bp)*	nmoles/uL		Vol. de muestra (uL)

1	CUS_I MSS_1 2					5 0 2	7 0 1	5027 01	41	738	617	0.000100 6826777	2.38	57 .6 2	
2	CUS_I MSS_1 3					5 0 2	7 0 2	5027 02	35	630	617	0.000085 94862728	2.79	57 .2 1	
3	CUS_I MSS_1 4					5 0 2	7 0 3	5027 03	29	522	617	0.000071 21457689	3.37	56 .6 3	
4	CUS_I MSS_1 7					5 0 2	7 0 4	5027 04	39	702	617	0.000095 77132754	2.51	57 .4 9	
5	CUS_I MSS_2 8					5 0 2	7 0 5	5027 05	48	864	617	0.000117 8724031	2.04	57 .9 6	
6	CUS_I MSS_5 5					5 0 2	7 0 6	5027 06	20	360	617	0.000049 1135013	4.89	55 .1 1	
7	CUS_I MSS_6 8					5 0 2	7 0 7	5027 07	24	432	617	0.000058 93620156	4.07	55 .9 3	
8	CUS_I MSS_7 1					5 0 2	7 0 1	5027 10	23	414	617	0.000056 4805265	4.25	55 .7 5	
9	CUS_I MSS_9 0					5 0 2	7 0 1	5027 11	36	648	617	0.000088 40430234	2.71	57 .2 9	
10	CUS_I MSS_9 4					5 0 2	7 0 2	5027 12	20	360	617	0.000049 1135013	4.89	55 .1 1	
11	CUS_I MSS_9 6					5 0 2	7 0 4	5027 14	38	684	617	0.000093 31565247	2.57	57 .4 3	
12	CUS_I MSS_9 7					5 0 2	7 0 5	5027 15	42	756	617	0.000103 1383527	2.33	57 .6 7	
13	CUS_I MSS_1 00					5 0 3	7 0 1	5037 01	20	360	617	0.000049 1135013	4.89	55 .1 1	Bioan alyzer
14	CUS_I MSS_1 11					5 0 3	7 0 2	5037 02	33	594	617	0.000081 03727715	2.96	57 .0 4	
15	CUS_I MSS_1 13					5 0 3	7 0 3	5037 03	49	882	617	0.000120 3280782	1.99	58 .0 1	
16	CUS_I MSS_1 18					5 0 3	7 0 4	5037 04	40	720	617	0.000098 2270026	2.44	57 .5 6	
17	CUS_I MSS_1 25					5 0 3	7 0 5	5037 05	31	558	617	0.000076 12592702	3.15	56 .8 5	

18	CUS_I MSS_1 45					5 0 3	7 0 6	5037 06	51	918	617	0.000125 2394283	1.92	58 .0 8	
19	CUS_I MSS_1 52					5 0 3	7 0 7	5037 07	40	720	617	0.000098 2270026	2.44	57 .5 6	
20	CUS_I MSS_1 57					5 0 3	7 1 0	5037 10	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6	
21	CUS_I MSS_1 59					5 0 3	7 1 1	5037 11	44	792	617	0.000108 0497029	2.22	57 .7 8	
22	CUS_I MSS_1 64					5 0 3	7 1 2	5037 12	46	828	617	0.000112 961053	2.12	57 .8 8	
23	CUS_I MSS_1 71					5 0 3	7 1 4	5037 14	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6	
24	CUS_I MSS_1 73					5 0 3	7 1 5	5037 15	40	720	617	0.000098 2270026	2.44	57 .5 6	
25	CUS_I MSS_1 81					5 0 5	7 0 1	5057 01	30	540	617	0.000073 67025195	3.26	56 .7 4	
26	CUS_I MSS_1 82					5 0 5	7 0 2	5057 02	41	738	617	0.000100 6826777	2.38	57 .6 2	
27	CUS_I MSS_1 83					5 0 5	7 0 3	5057 03	32	576	617	0.000078 58160208	3.05	56 .9 5	
28	CUS_I MSS_1 90					5 0 5	7 0 4	5057 04	9.5	171	617	0.000023 32891312	10.2 9	49 .7 1	Bioan alyzer
29	CUS_I MSS_2 18					5 0 5	7 0 5	5057 05	12	216	617	0.000029 46810078	8.14	51 .8 6	
30	CUS_I MSS_2 35					5 0 5	7 0 6	5057 06	28	504	617	0.000068 75890182	3.49	56 .5 1	
31	CUS_I MSS_2 47					5 0 5	7 0 7	5057 07	23	414	617	0.000056 4805265	4.25	55 .7 5	
32	CUS_I MSS_2 51					5 0 5	7 1 0	5057 10	29	522	617	0.000071 21457689	3.37	56 .6 3	
33	CUS_I MSS_2 68					5 0 5	7 1 1	5057 11	14	252	617	0.000034 37945091	6.98	53 .0 2	
34	CUS_I MSS_2 73					5 0 5	7 1 2	5057 12	34	612	617	0.000083 49295221	2.87	57 .1 3	

35	CUS_I MSS_2 81					5 0 5	7 1 4	5057 14	28	504	617	0.000068 75890182	3.49	56 .5 1	
36	CUS_I MSS_2 85					5 0 5	7 1 5	5057 15	15	270	617	0.000036 83512598	6.52	53 .4 8	
37	CUS_I MSS_2 96					5 0 6	7 0 1	5067 01	34	612	617	0.000083 49295221	2.87	57 .1 3	
38	CUS_I MSS_2 99					5 0 6	7 0 2	5067 02	25	450	617	0.000061 39187663	3.91	56 .0 9	
39	CUS_I MSS_3 04					5 0 6	7 0 3	5067 03	38	684	617	0.000093 31565247	2.57	57 .4 3	
40	CUS_I MSS_3 07					5 0 6	7 0 4	5067 04	43	774	617	0.000105 5940278	2.27	57 .7 3	
41	CUS_I MSS_3 13					5 0 6	7 0 5	5067 05	60	1080	617	0.000147 3405039	1.63	58 .3 7	
42	CUS_I MSS_3 36					5 0 6	7 0 6	5067 06	40	720	617	0.000098 2270026	2.44	57 .5 6	
43	CUS_I MSS_3 38					5 0 6	7 0 7	5067 07	24	432	617	0.000058 93620156	4.07	55 .9 3	
44	CUS_I MSS_3 55					5 0 6	7 1 0	5067 10	31	558	617	0.000076 12592702	3.15	56 .8 5	
45	CUS_I MSS_3 60					5 0 6	7 1 1	5067 11	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6	Bioan alyzer
46	CUS_I MSS_2					5 0 6	7 1 2	5067 12	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6	
47	CUS_I MSS_4					5 0 6	7 1 4	5067 14	38	684	617	0.000093 31565247	2.57	57 .4 3	
48	CUS_I MSS_5					5 0 6	7 1 5	5067 15	45	810	617	0.000110 5053779	2.17	57 .8 3	
49	CUS_I MSS_9					5 0 7	7 0 1	5077 01	32	576	617	0.000078 58160208	3.05	56 .9 5	
50	CUS_I MSS_1 0					5 0 7	7 0 2	5077 02	33	594	617	0.000081 03727715	2.96	57 .0 4	
51	CUS_I MSS_1 1					5 0 7	7 0 3	5077 03	50	900	617	0.000122 7837533	1.95	58 .0 5	

52	CUS_I MSS_2 1					5 0 7	7 0 4	5077 04	51	918	617	0.000125 2394283	1.92	58 .0 8	Bioan alyzer
53	CUS_I MSS_2 4					5 0 7	7 0 5	5077 05	31	558	617	0.000076 12592702	3.15	56 .8 5	
54	CUS_I MSS_2 7					5 0 7	7 0 6	5077 06	35	630	617	0.000085 94862728	2.79	57 .2 1	
55	CUS_I MSS_3 3					5 0 7	7 0 7	5077 07	41	738	617	0.000100 6826777	2.38	57 .6 2	
56	CUS_I MSS_4 0					5 0 7	7 0 1	5077 10	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6	
57	CUS_I MSS_4 4					5 0 7	7 0 1	5077 11	22	396	617	0.000054 02485143	4.44	55 .5 6	
58	CUS_I MSS_5 2					5 0 7	7 0 1	5077 12	46	828	617	0.000112 961053	2.12	57 .8 8	
59	CUS_I MSS_6 0					5 0 7	7 0 1	5077 14	31	558	617	0.000076 12592702	3.15	56 .8 5	
60	CUS_I MSS_6 7					5 0 7	7 0 1	5077 15	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6	
61	CUS_I MSS_8 3					5 0 8	7 0 1	5087 01	27	486	617	0.000066 30322676	3.62	56 .3 8	
62	CUS_I MSS_8 7					5 0 8	7 0 0	5087 02	42	756	617	0.000103 1383527	2.33	57 .6 7	
63	CUS_I MSS_9 2					5 0 8	7 0 0	5087 03	35	630	617	0.000085 94862728	2.79	57 .2 1	
64	CUS_I MSS_9 8					5 0 8	7 0 0	5087 04	16	288	617	0.000039 29080104	6.11	53 .8 9	
65	CUS_I MSS_1 07					5 0 8	7 0 0	5087 05	14	252	617	0.000034 37945091	6.98	53 .0 2	Bioan alyzer
66	CUS_I MSS_1 09					5 0 8	7 0 0	5087 06	30	540	617	0.000073 67025195	3.26	56 .7 4	
67	CUS_I MSS_1 12					5 0 8	7 0 0	5087 07	20	360	617	0.000049 1135013	4.89	55 .1 1	
68	CUS_I MSS_1 16					5 0 8	7 0 0	5087 10	26	468	617	0.000063 84755169	3.76	56 .2 4	

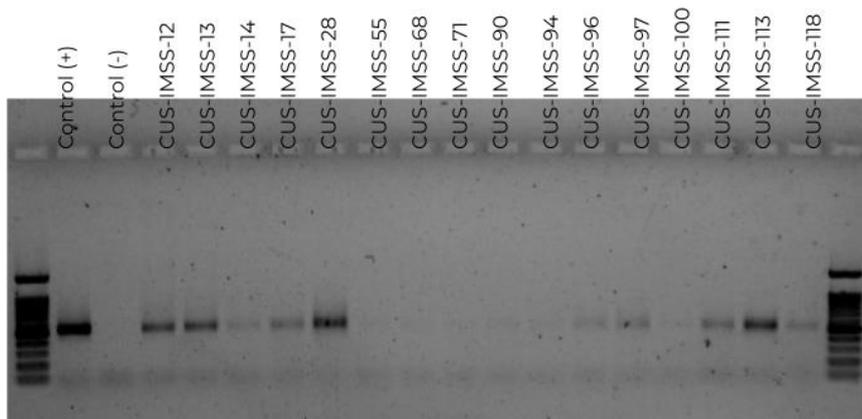
69	CUS_I MSS_1 28					5 0 8	7 1 1	5087 11	39	702	617	0.000095 77132754	2.51	57 .4 9
70	CUS_I MSS_1 30					5 0 8	7 1 2	5087 12	14	252	617	0.000034 37945091	6.98	53 .0 2
71	CUS_I MSS_1 32					5 0 8	7 1 4	5087 14	29	522	617	0.000071 21457689	3.37	56 .6 3
72	CUS_I MSS_1 41					5 0 8	7 1 5	5087 15	38	684	617	0.000093 31565247	2.57	57 .4 3
73	CUS_I MSS_1 43					5 1 0	7 0 1	5107 01	42	756	617	0.000103 1383527	2.33	57 .6 7
74	CUS_I MSS_1 46					5 1 0	7 0 2	5107 02	36	648	617	0.000088 40430234	2.71	57 .2 9
75	CUS_I MSS_1 56					5 1 0	7 0 3	5107 03	31	558	617	0.000076 12592702	3.15	56 .8 5
76	CUS_I MSS_1 60					5 1 0	7 0 4	5107 04	41	738	617	0.000100 6826777	2.38	57 .6 2
77	CUS_I MSS_1 76					5 1 0	7 0 5	5107 05	24	432	617	0.000058 93620156	4.07	55 .9 3
78	CUS_I MSS_1 87					5 1 0	7 0 6	5107 06	26	468	617	0.000063 84755169	3.76	56 .2 4
79	CUS_I MSS_2 07					5 1 0	7 0 7	5107 07	30	540	617	0.000073 67025195	3.26	56 .7 4
80	CUS_I MSS_2 19					5 1 0	7 1 0	5107 10	32	576	617	0.000078 58160208	3.05	56 .9 5
81	CUS_I MSS_2 22					5 1 0	7 1 1	5107 11	33	594	617	0.000081 03727715	2.96	57 .0 4
82	CUS_I MSS_2 25					5 1 0	7 1 2	5107 12	21	378	617	0.000051 56917637	4.65	55 .3 5
83	CUS_I MSS_2 34					5 1 0	7 1 4	5107 14	36	648	617	0.000088 40430234	2.71	57 .2 9
84	CUS_I MSS_2 65					5 1 0	7 1 5	5107 15	36	648	617	0.000088 40430234	2.71	57 .2 9
85	CUS_I MSS_2 94					5 1 1	7 0 1	5117 01	45	810	617	0.000110 5053779	2.17	57 .8 3

86	CUS_I MSS_3 09					5 1 1	7 0 2	5117 02	38	684	617	0.000093 31565247	2.57	57 .4 3
87	CUS_I MSS_3 23					5 1 1	7 0 3	5117 03	42	756	617	0.000103 1383527	2.33	57 .6 7
88	CUS_I MSS_3 29					5 1 1	7 0 4	5117 04	30	540	617	0.000073 67025195	3.26	56 .7 4
89	CUS_I MSS_3 39					5 1 1	7 0 5	5117 05	35	630	617	0.000085 94862728	2.79	57 .2 1
90	CUS_I MSS_3 54					5 1 1	7 0 6	5117 06	27	486	617	0.000066 30322676	3.62	56 .3 8
91	CUS_I MSS_3 58					5 1 1	7 0 7	5117 07	32	576	617	0.000078 58160208	3.05	56 .9 5
92	CUS_I MSS_3 73					5 1 1	7 1 0	5117 10	37	666	617	0.000090 85997741	2.64	57 .3 6
93	CUS_I MSS_3 86					5 1 1	7 1 1	5117 11	42	756	617	0.000103 1383527	2.33	57 .6 7
94	CUS_I MSS_3 88					5 1 1	7 1 2	5117 12	28	504	617	0.000068 75890182	3.49	56 .5 1
95	CUS_I MSS_3 77					5 0 2	7 1 6	5027 16	13	234	617	0.000031 92377585	7.52	52 .4 8
96	CUS_I MSS_3 83					5 0 2	7 1 8	5027 18	8.8	158.4	617	0.000021 60994057	11.1 1	48 .8 9
97	CUS_I MSS_3 92					5 0 2	7 1 9	5027 19	13	234	617	0.000031 92377585	7.52	52 .4 8
98	CUS_I MSS_3 96					5 0 2	7 2 0	5027 20	1.7 7	31.86	617	0.000004 34654486 5	55.2 2	4. 78
99	CUS_I MSS_3 99					5 0 2	7 2 1	5027 21	7.5	135	617	0.000018 41756299	13.0 3	46 .9 7
100	CUS_I MSS_4 16					5 0 2	7 2 2	5027 22	11	198	617	0.000027 01242572	8.88	51 .1 2

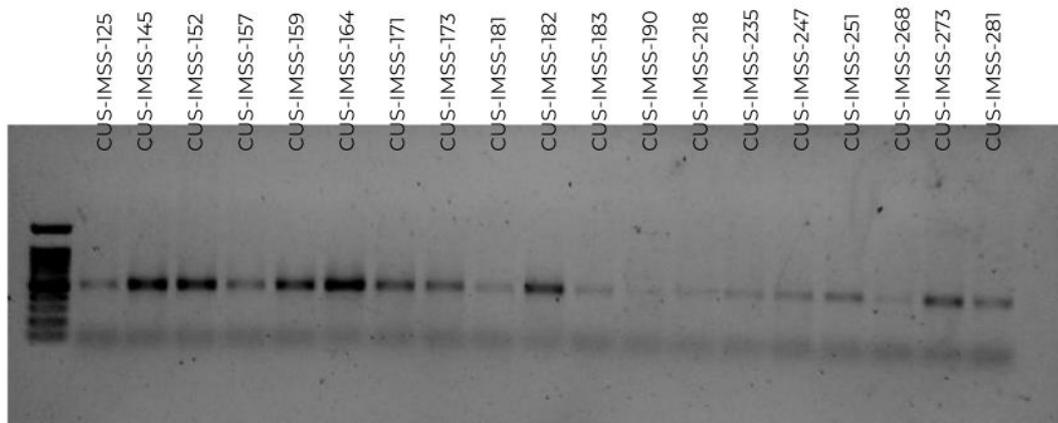
# Anexo 3.3.- GELES AMPLIFICACIÓN PCR 16S

Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, revelados por exposición a luz UV, el marcador de peso molecular va de 100 bp a 1,000 bp de abajo hacia arriba.

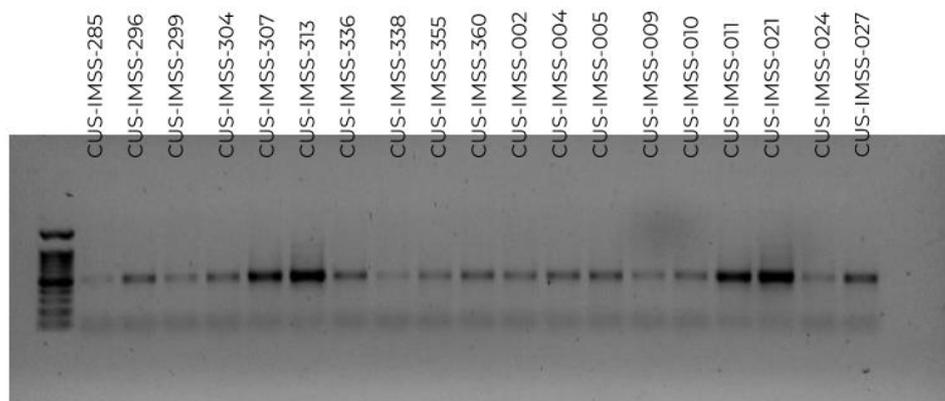
## PCR 16S 94 muestras



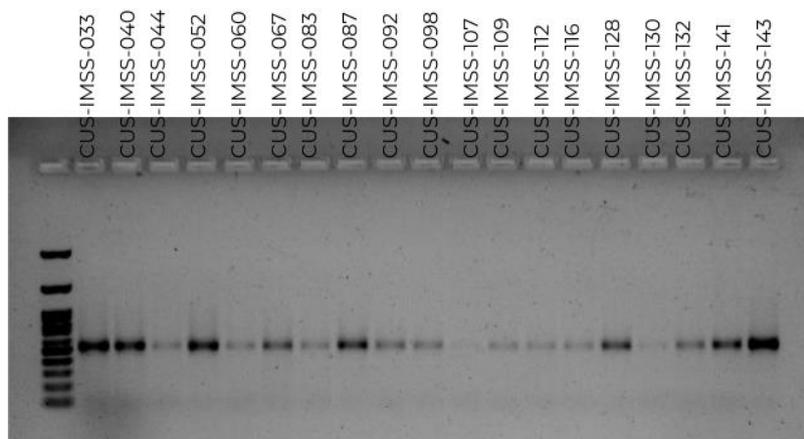
## PCR 16S 94 muestras



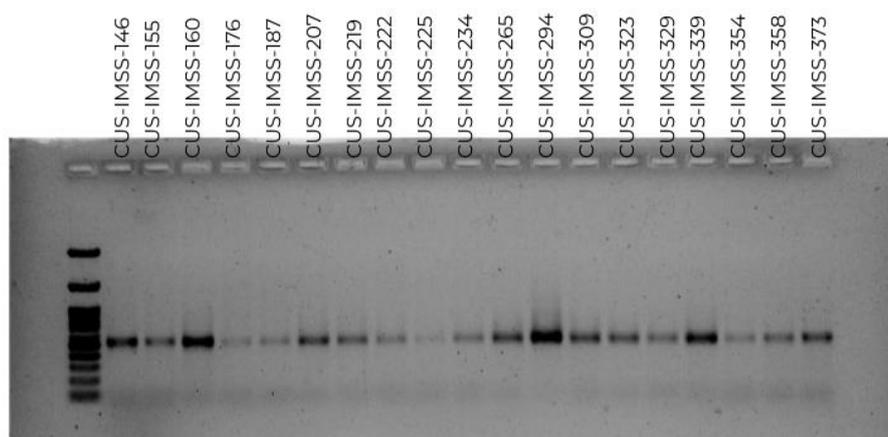
## PCR 16S 94 muestras



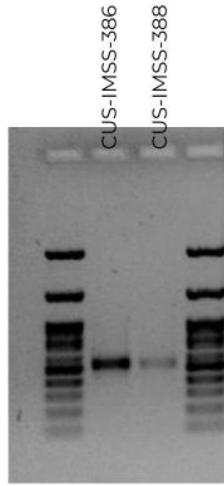
## PCR 16S 94 muestras



## PCR 16S 94 muestras



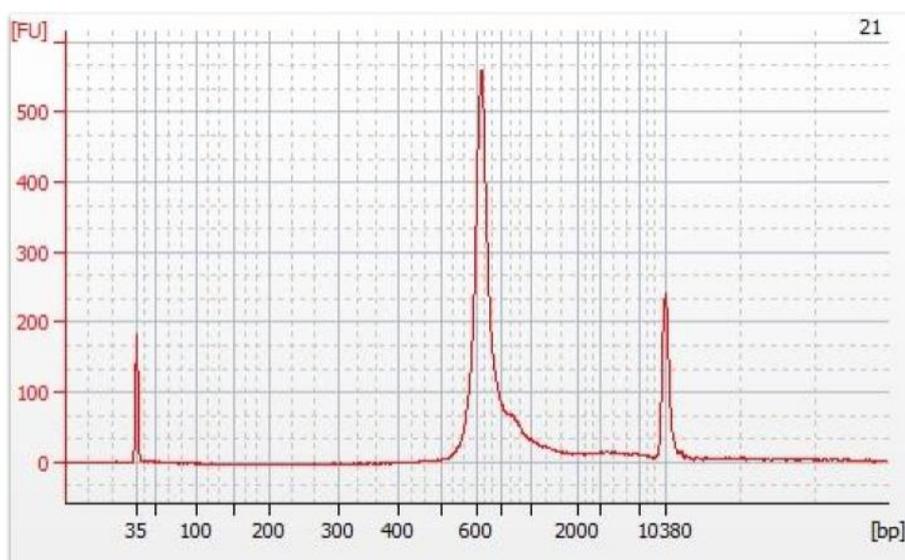
# PCR 16S 94 muestras



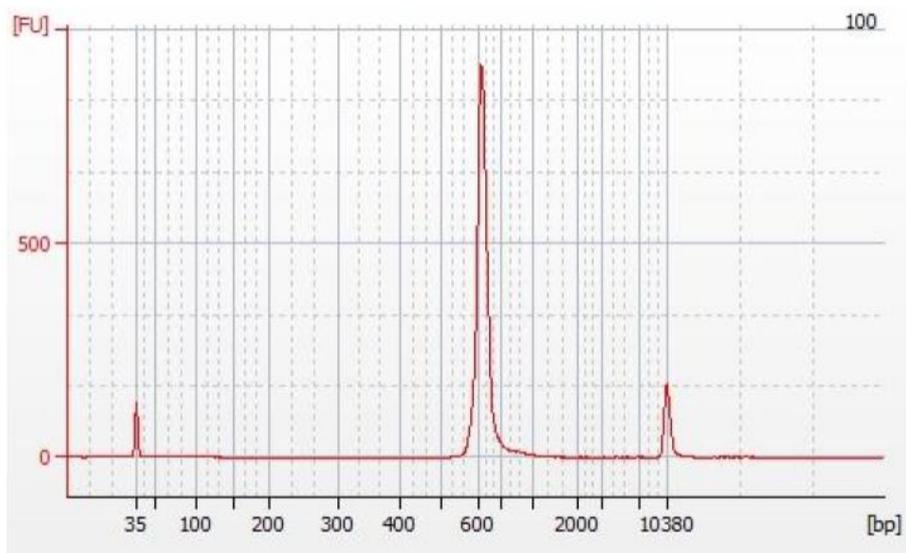
# Anexo 3.4

## ELECTROFEROGRAMAS BIBLIOTECAS FINALES

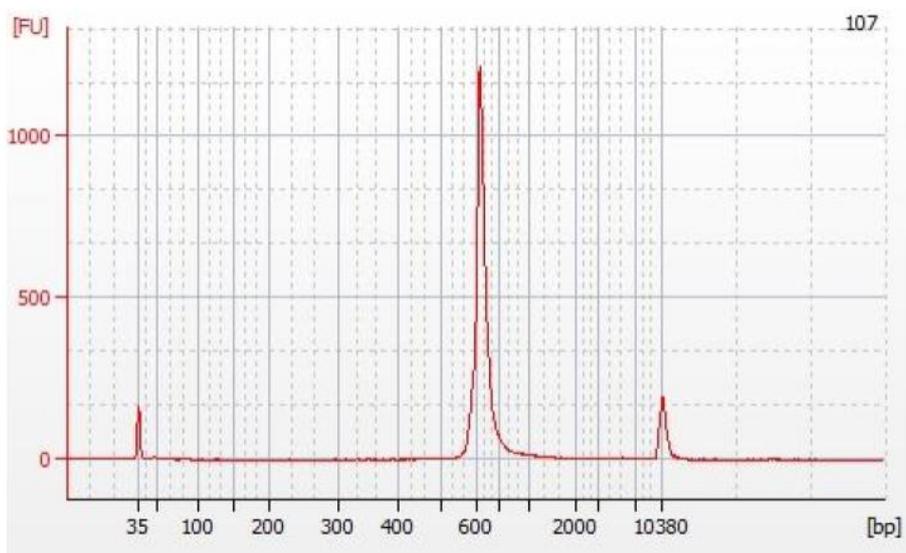
Electroferogramas de alta sensibilidad obtenidos en el equipo Bioanalyzer



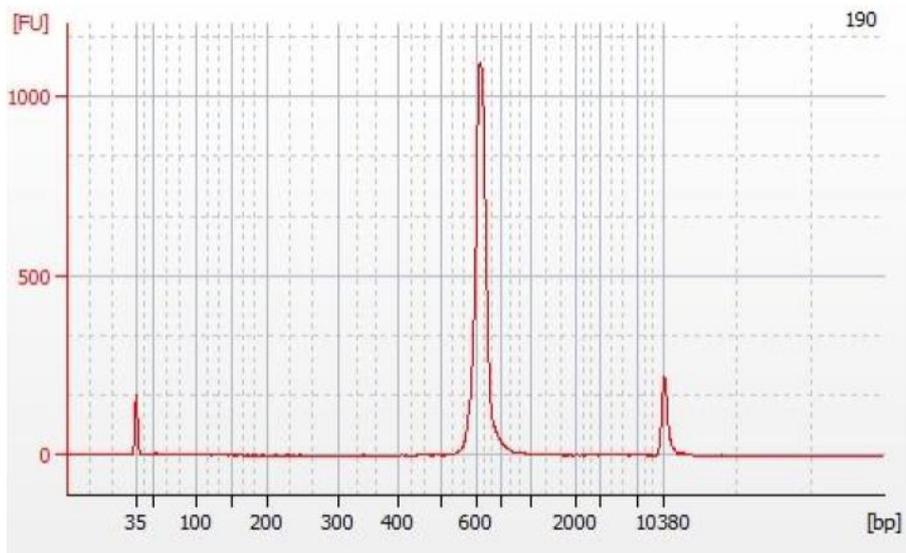
**Muestra: IMSS-CUSI-21**



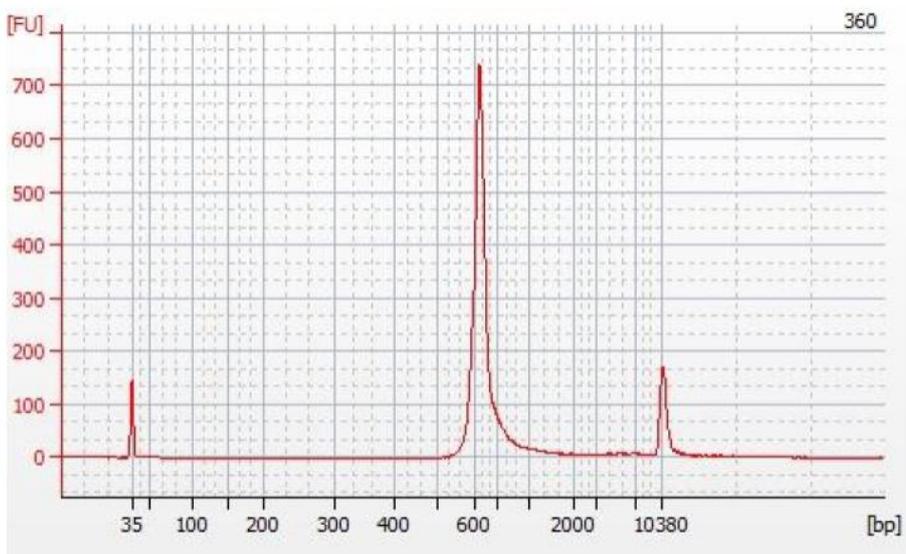
**Muestra: IMSS-CUSI-100**



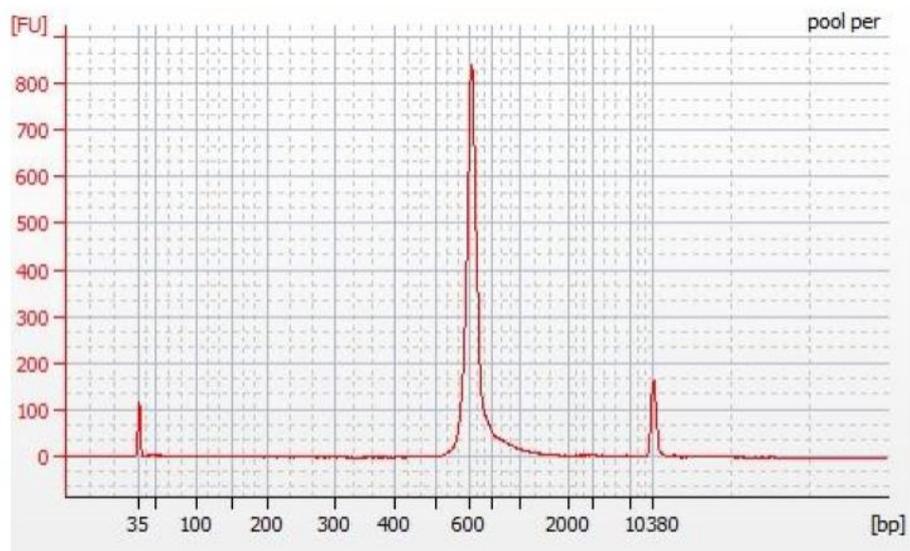
**Muestra: IMSS-CUSI-107**



**Muestra: IMSS-CUSI-190**



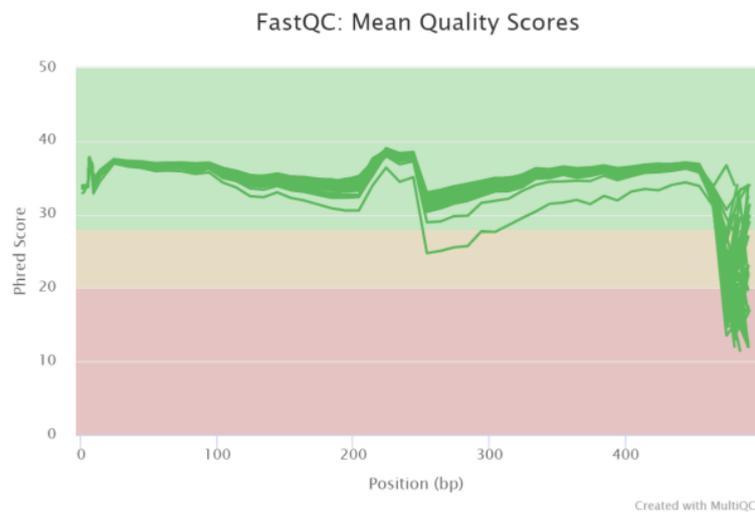
**Muestra: IMSS-CUSI-360**



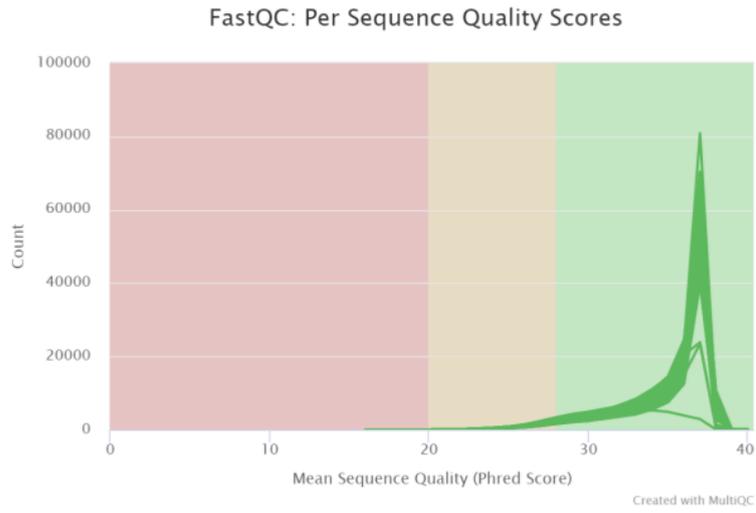
**POOL final (Todas las muestras)**

# Anexo 4.1.- RESUMEN DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS

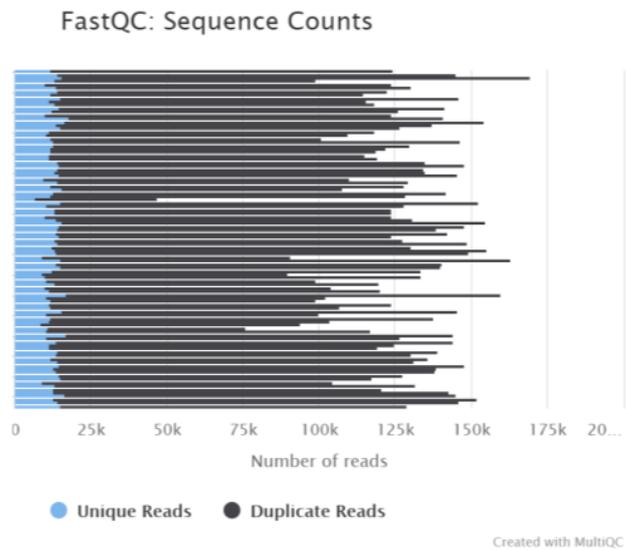
Parámetros de calidad de la secuenciación de las muestras, obtenidas con el programa multiqc



Calidad phred promedio por base.

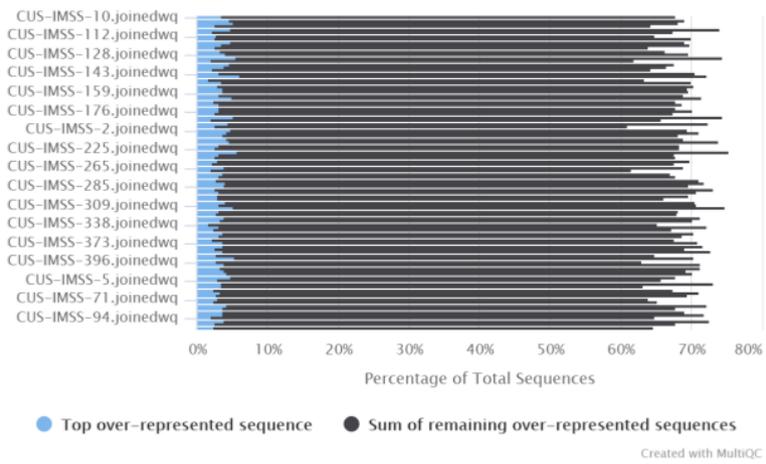


Calidad phred promedio por número de lecturas



Numero de lecturas, separadas por lecturas unicas y duplicados

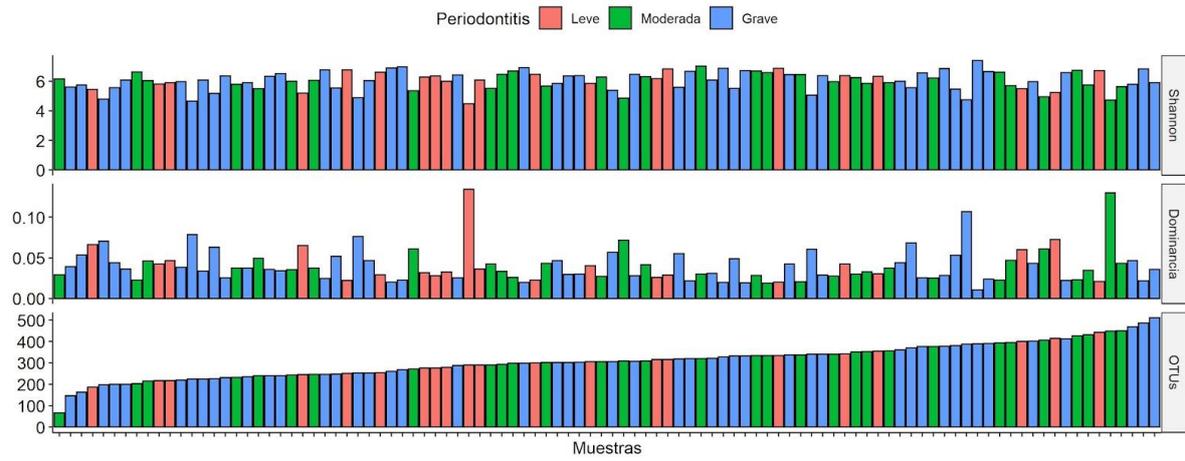
### FastQC: Overrepresented sequences



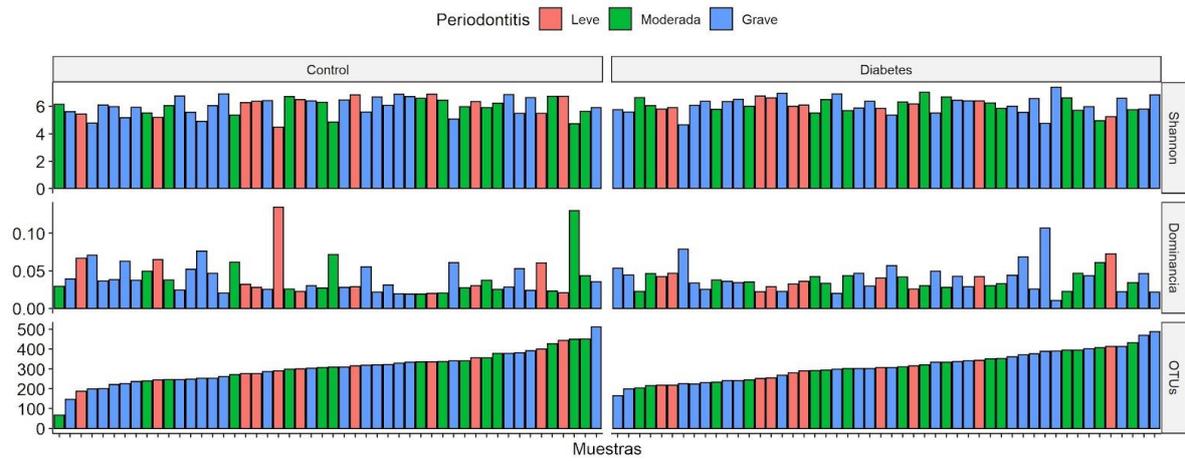
Porcentaje de lecturas sobre representadas

## Anexo 5

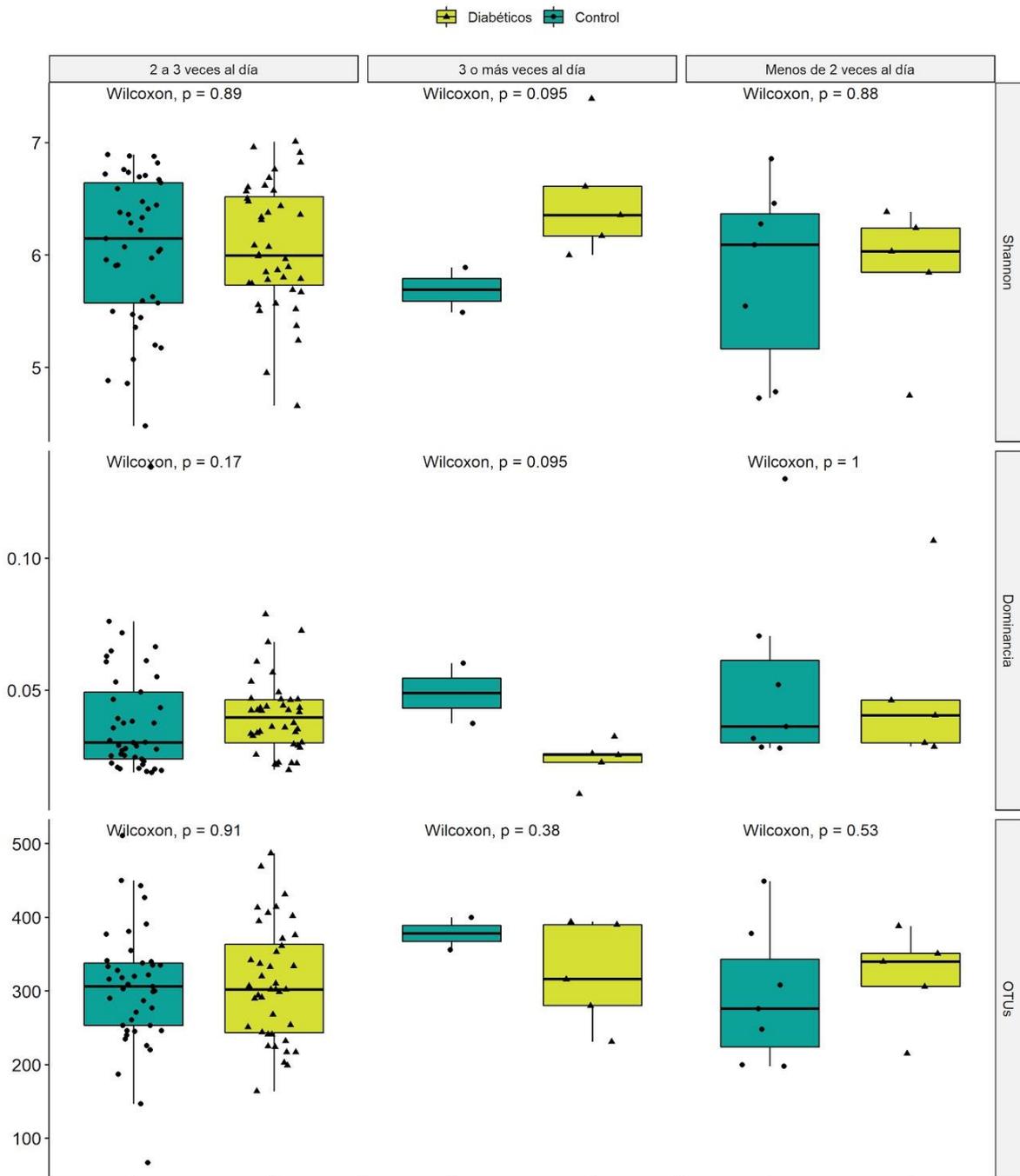
Índices de Diversidad Alfa



Índices de Diversidad Alfa

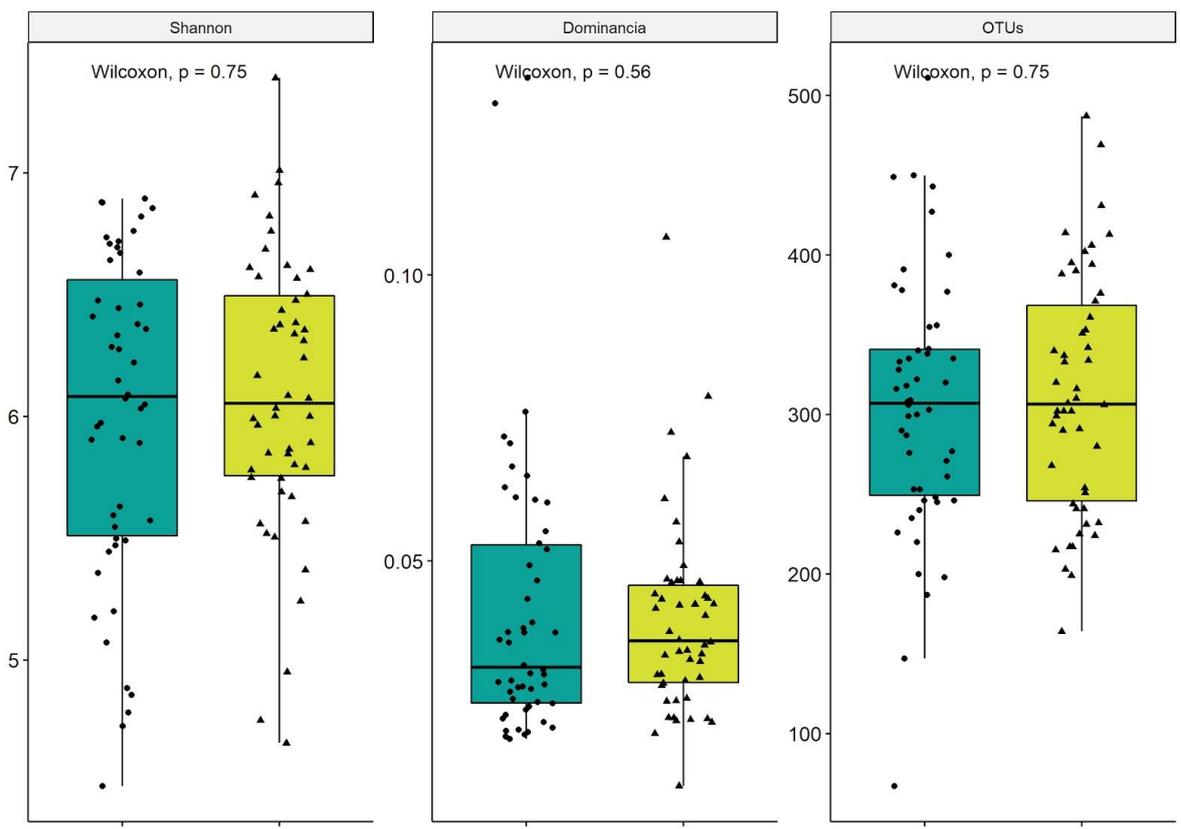


# Cepillado Diario

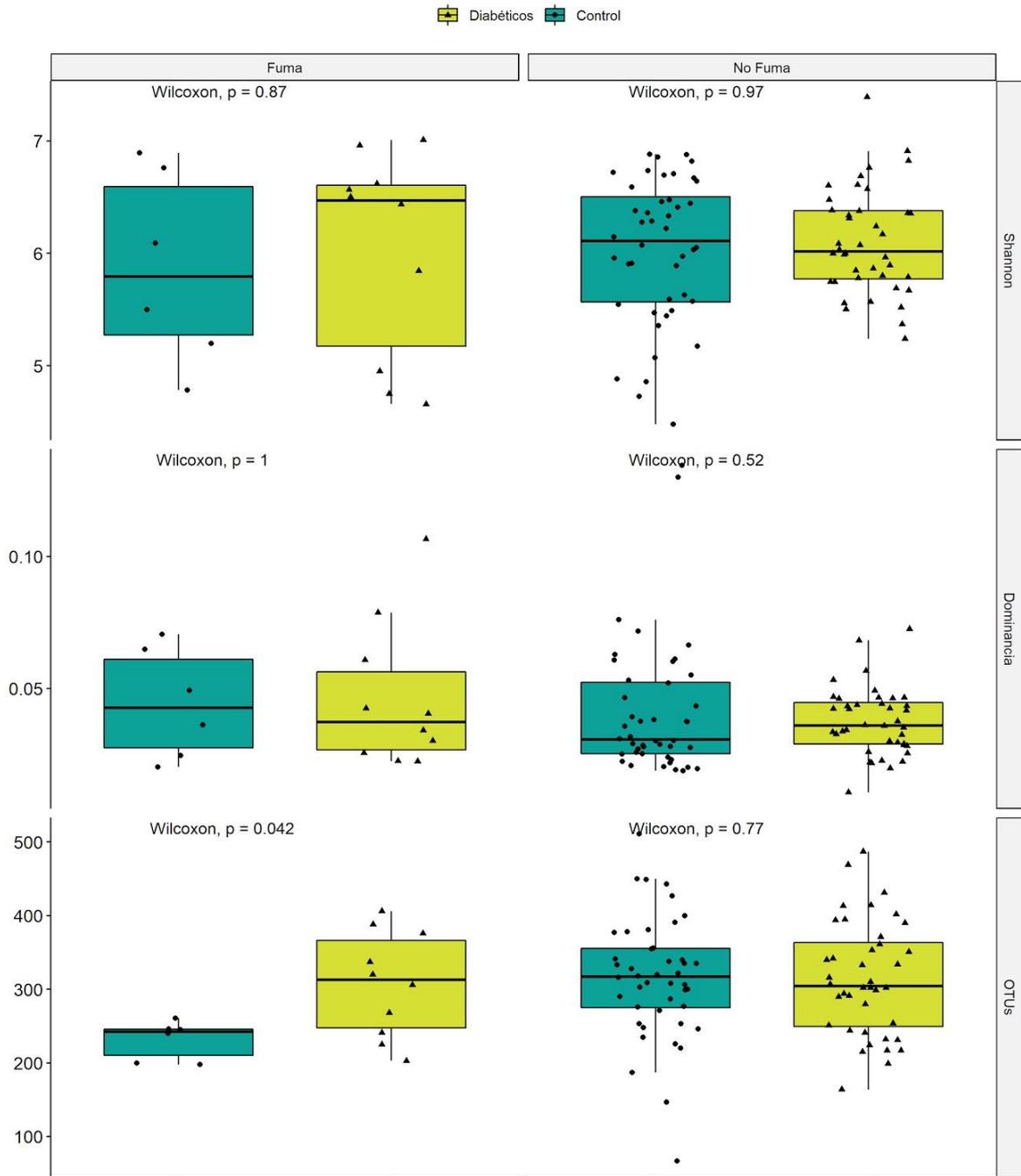


# Diabetes

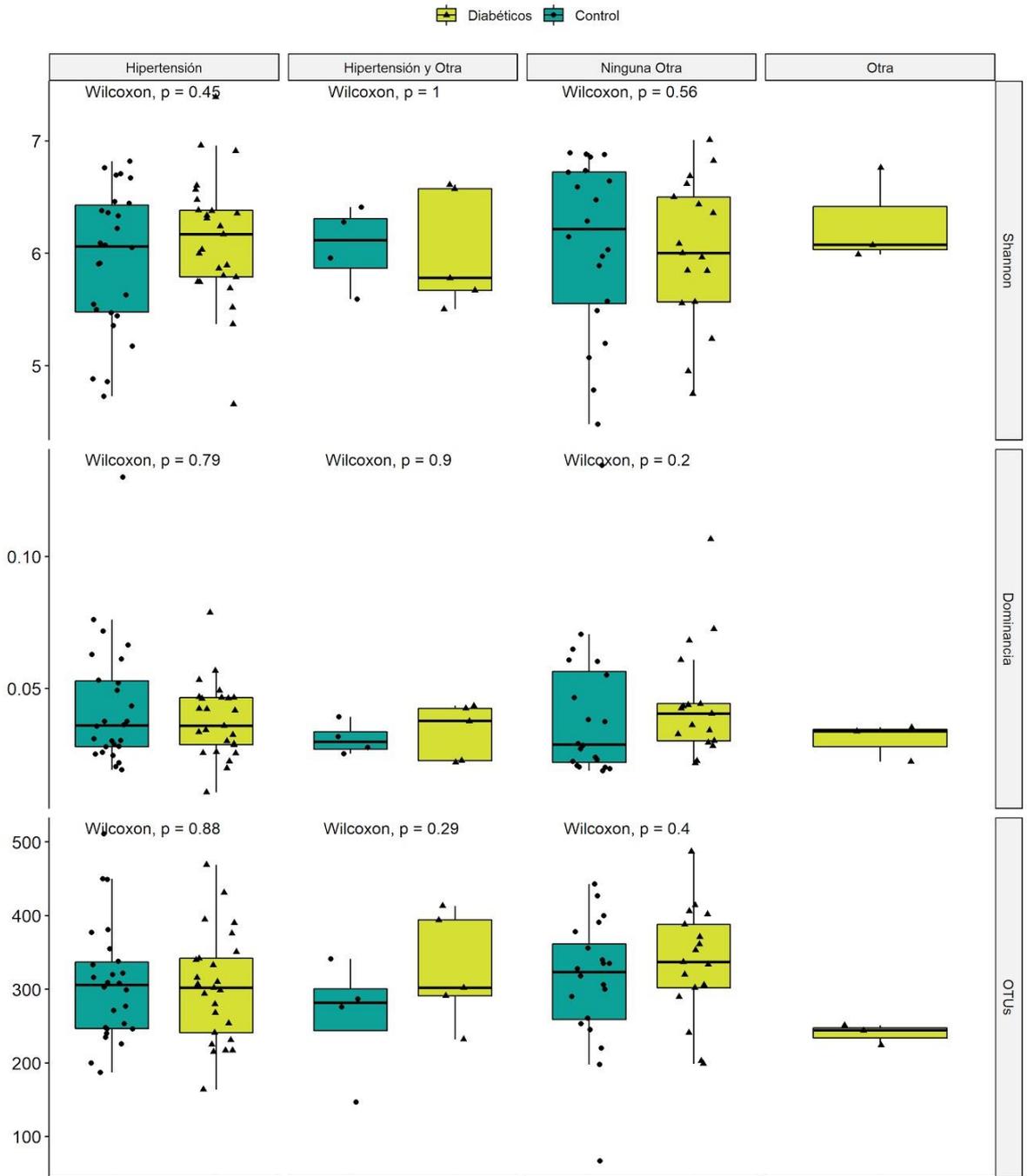
Diabéticos Control



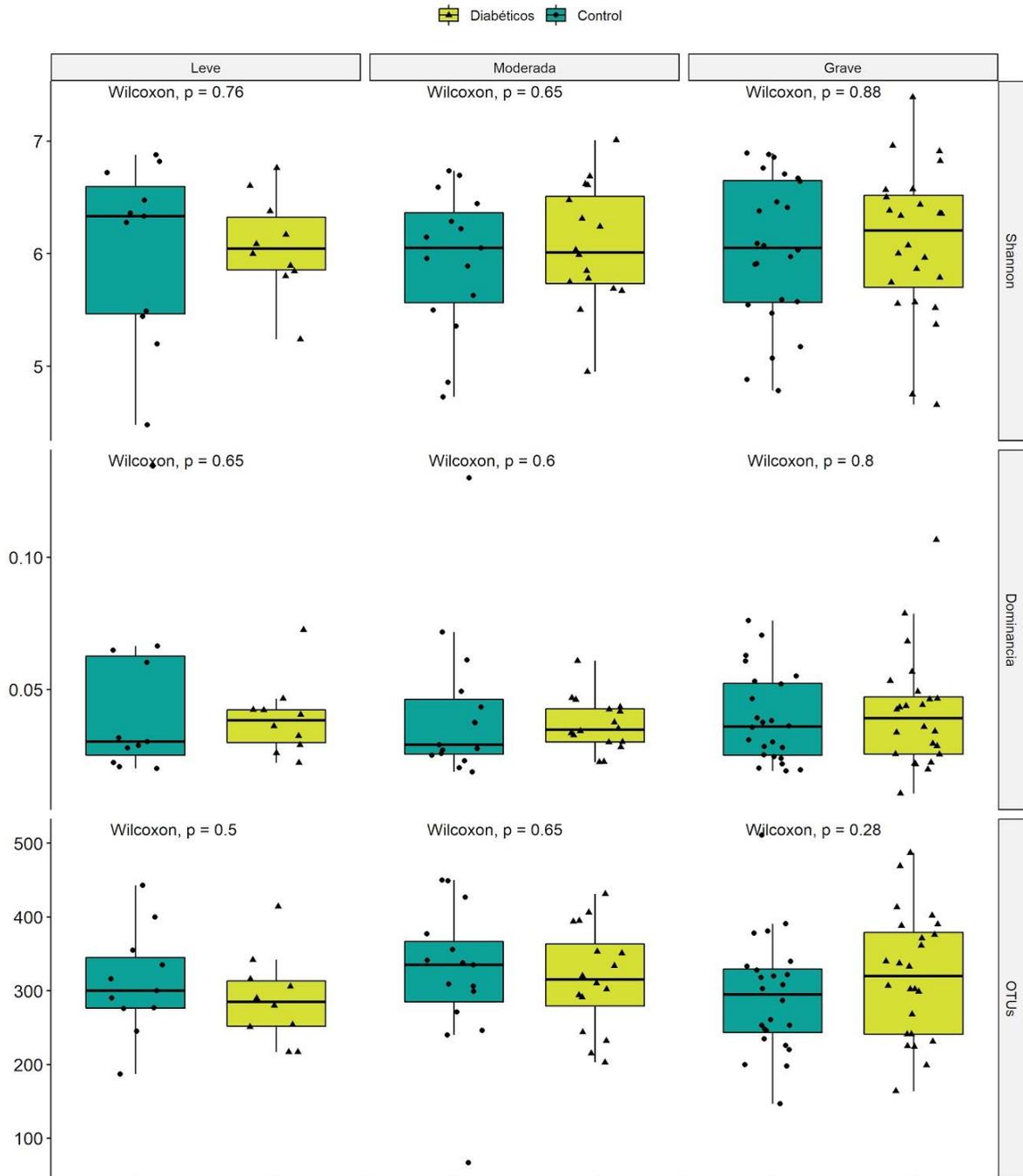
Tabaquismo



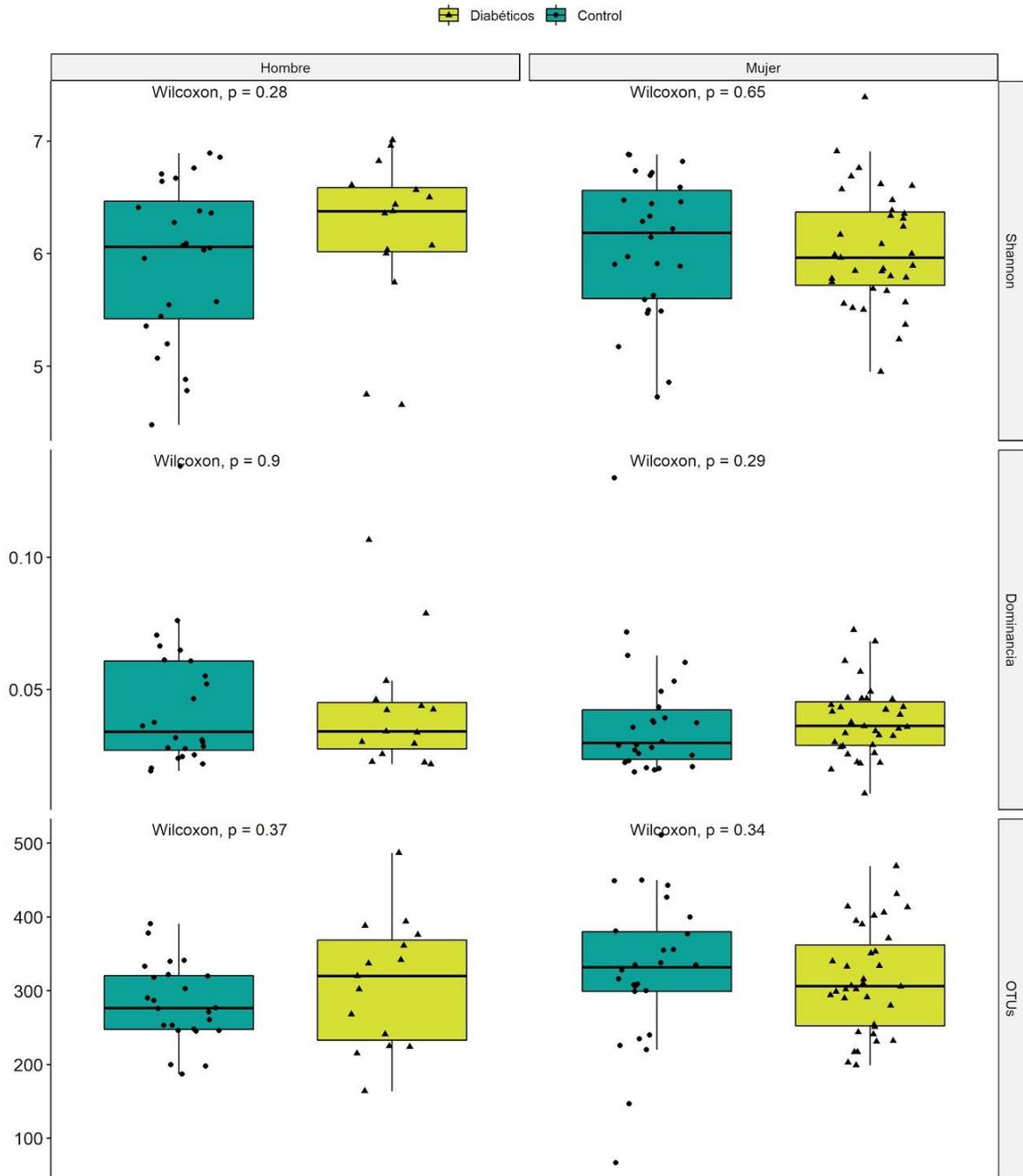
# Comorbilidad



Periodontitis



Sexo



*Anexo 6*

