



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**



---

---

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS EN  
SALIVA DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA  
PULMONAR A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

KAREN GIOVANNA DELGADO NEGRETE

TUTORA: DRA GABRIELA ELISA MERCADO CELIS.

ASESOR: MTRO EZEQUIEL ALEJANDRO PÉREZ IBARRA.

MÉXICO, Cd. Mx.

2023



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.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi familia.

Para las dos mujeres que me inspiran día con día, quienes me han enseñado a creer en mí a través de su magia y me acompañan desde que tengo memoria en cualquier aventura que decido emprender, gracias por formar parte de esta también. Mis dos papás, uno a quien le debo el aceptarme como soy, porque él fue la primera persona que lo hizo, me ha apoyado, creyendo en mí a cada momento, gracias a ti sé que puedo lograr cualquier cosa. Al otro por quien miro al cielo y sonrío. Son mi más grande tesoro.

Y a quienes me enseñaron lo maravillosa que es la odontología y la ciencia, gracias a ustedes sé que no quiero dejar de aprender. Gracias.

# ANÁLISIS DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS EN SALIVA DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR A TRAVÉS DE LA SECUENCIACIÓN DEL gen 16S.

## Contenido

1.	RESUMEN.....	6
2.	ANTECEDENTES .....	6
2.1.	BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS .....	6
2.1.1.	Enfermedad periodontal	6
2.1.2.	Clasificación de bacterias asociadas a enfermedad periodontal	7
	Otros factores relacionados a enfermedad periodontal .....	9
2.1.2.1.	Tabaquismo.	9
2.1.2.2.	Dieta y nutrición	9
2.1.2.3.	Factores genéticos	10
2.1.2.4.	Enfermedades sistémicas	10
2.1.2.4.1.	DIABETES.	10
2.1.2.4.2.	ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.	11
2.1.2.4.3.	ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.	11
2.2.	CÁNCER DE PULMÓN .....	12
2.2.1.	Factores de riesgo.	12
2.2.2.	Clasificación Histopatológica.	13
2.2.3.	Estadificación	13
2.3.	MICROBIOMA. ....	14
2.3.1.	Definición	14
2.3.2.	Microbioma oral	14
2.3.3.	Microbioma oral y cáncer	15
2.4.	ENFERMEDAD PERIODONTAL Y CÁNCER.....	18
2.5.	SALIVA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO. ....	20
2.5.1.	Saliva	20
2.5.2.	Biomarcadores salivales.	20
2.6.	GENÉTICA BACTERIANA.....	22
2.6.1.	Gen ARNr 16 S	22
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	23
4.	JUSTIFICACIÓN .....	23

5.	HIPÓTESIS.....	24
6.	OBJETIVOS.....	24
7.	METODOLOGÍA.....	25
7.1.	TIPO DE ESTUDIO .....	25
7.2.	CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	25
7.2.1.	Criterios de inclusión.	25
7.2.2.	Criterios de exclusión	26
7.2.3.	Criterios de eliminación.	26
7.3.	Flujo de trabajo para el desarrollo experimental del proyecto .....	26
7.4.	Estadística descriptiva y comparativa. ....	27
8.	RESULTADOS. ....	27
7.1	Descripción de la población. ....	27
7.2	Diversidad alfa (Índices de Shannon y Simpson) .....	31
7.3.	Diversidad beta (Unifrac ponderado, Unifrac no ponderado y Bray-Curtis).....	32
7.4.	Perfiles bacterianos de casos y controles (Abundancia relativa). ....	33
7.5	Diferencia taxonómica casos/controles.....	35
9.	DISCUSIÓN. ....	36
10.	CONCLUSIONES. ....	40
11.	ANEXOS.....	41
	Anexo 1 Estadificación Cáncer de Pulmón.....	41
	Anexo 2. Consentimiento informado. ....	46
	Anexo 3. Tabla de variables. ....	47
	Anexo 4. Protocolos utilizados para la metodología. ....	50
	Toma de muestra.	50
	Procesamiento de saliva.	50
	Extracción del ADN bacteriano.	51
	Cuantificación de ADN bacteriano	52
	Análisis de datos de Secuenciación.	59
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	60

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. BACTERIAS INVOLUCRADAS EN LAS DIFERENTES CONDICIONES PERIODONTALES.	8
Tabla 2. BACTERIAS ORALES COMO BIOMARCADORES DE TIPOS ESPECÍFICOS DE CÁNCER	16
Tabla 3. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE POBLACIÓN DE ESTUDIO	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE CASOS	31

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. METODOLOGÍA	27
Ilustración 2. DIVERSIDAD ALFA.	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 3. DIVERSIDAD BETA	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 4. ABUNDANCIA RELATIVA A NIVEL DE FILO	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 5. ABUNDANCIA RELATIVA A NIVEL DE FAMILIA	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 6. ABUNDANCIA RELATIVA A NIVEL DE GÉNERO.	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Ilustración 7. DIFERENCIA TAXONÓMICA ENTRE FILO Y GÉNERO	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## 1. RESUMEN.

Uno de los problemas más importantes en la salud bucodental es la enfermedad periodontal, que además se encuentra asociada con enfermedades sistémicas como el cáncer. La relación es compleja y ha sido estudiada desde diferentes perspectivas, una de ellas se enfoca en el cambio del microbioma oral y en como esto afecta órganos o sitios anatómicos cercanos como los pulmones. La cavidad bucal humana cuenta con el segundo microbioma más diverso del cuerpo humano y el estudio del mismo se ha ido enriqueciendo con métodos de identificación bacteriana más precisos como la secuenciación genética a través de la saliva. El describir una morbilidad asociada entre las enfermedades antes mencionadas sugiere que los enfoques que mantienen la salud bucal y la simbiosis del microbioma bucal podrían reducir la incidencia de cáncer de pulmón y mejorar la evolución del mismo y no sólo eso, podría encontrarse un microorganismo específico que ayude al diagnóstico de cáncer pulmonar en estadios más tempranos para pacientes con alto riesgo a padecerlo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

#### 2.1.1. Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal (EP), es considerada una patología inflamatoria, crónica de origen multifactorial, que tiene como factor etiológico primario a la formación de una biopelícula de origen bacteriano altamente organizada que cuenta con un nicho ecológico favorable para su crecimiento y desarrollo; además de factores adicionales de origen local y sistémico ocasionan la contaminación y destrucción de los tejidos de soporte del diente (epitelios, tejido conectivo, ligamento periodontal, hueso alveolar, cemento radicular). Sus principales manifestaciones clínicas incluyen sangrado, movilidad dental, recesión gingival, formación de bolsa periodontal, disfunción masticatoria y pérdida de órganos dentales. Adicionalmente existe evidencia científica que vincula a la enfermedad periodontal con otras enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica,

enfermedad cardiovascular, cáncer, entre otras, además de ser considerada, según la Organización Mundial de la Salud, uno de los dos principales problemas de salud bucal a nivel mundial. (1)

### 2.1.2. Clasificación de bacterias asociadas a enfermedad periodontal

La interacción del microbioma oral y el desarrollo de la periodontitis es compleja. La complejidad surge de la amplia gama de especies bacterianas residentes dentro de la cavidad oral que además cuenta con especies consideradas destructivas para los tejidos periodontales. No obstante, han surgido algunos principios generales que definen el papel de la microbiota en la enfermedad periodontal. (2)

Antes de comprender el mecanismo de acción de las bacterias respecto a la enfermedad periodontal, es importante contar con la información necesaria sobre la biopelícula dental y entender la importancia que tiene un en el estudio de las bacterias periodontopatógenas. La biopelícula dental o biofilm es la organización microbiana compuesta por microorganismos que se adhieren a las superficies dentales. Presenta características como, heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos, y capacidad de comunicación intercelular, esto la convierten en un complejo difícil de erradicar de los ambientes en donde se establecen. (1)

Las bacterias son esenciales para el desarrollo de enfermedades destructivas de los tejidos periodontales, incluso su eliminación se ve involucrada en la reversión de esta afección. Además, los cambios a gran escala en la estructura general de la población microbiana de las biopelículas subgingivales y la carga bacteriana se asocian, invariablemente, con enfermedad periodontal. (2)

Los estudios microbiológicos realizados a través de cultivo, han demostrado que, ante la abstención de la higiene oral, se produce un cambio en las especies dominantes presentes en las comunidades subgingivales, aumentando su abundancia después de 2 a 3 semanas de acumulación de placa dentobacteriana; la cual es resultado de la suma de subproductos bacterianos como enzimas, restos



de comida, células descamadas, calcio y fosfato. Todos estos cambios se correlacionan con la aparición de inflamación clínica de la encía.

Estas primeras investigaciones se han complementado con la secuenciación del gen 16S rRNA para la caracterización del microbioma. Esta técnica ha revelado especies bacterianas dominantes en comunidades microbianas asociadas a la salud periodontal, gingivitis y periodontitis como se muestra en la tabla 1. (3)

Periodonto sano	Periodontitis	Gingivitis
<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Porphyromonas gingivalls</i>	<i>Actinomyces sp. HOT 169</i>
<i>Rothia aeria.</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>
<i>Corynebacterium matruchotii.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>	<i>polymorphum</i>
<i>Streptococcus sp. HOT 071</i>	<i>animalis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Neisseria sp.</i>	<i>Prevotella tantear</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Fusobacterium nicleatum ss.</i>	<i>Leptotrichia sp.</i>	<i>Prevotella oris</i>
<i>vincentii</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Alloprevotella tannerae</i>
<i>Lautropia mirabiliis</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Neisseria oralis</i>
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Haemophilus parainfluenziae</i>
<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>
<i>Streptococcus sp. HOT 058</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>animalis</i>
<i>Prevotella sp.</i>	<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>Corynebacterium durum</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Leptotrichia wadei</i>
<i>Neisseria elongata</i>	<i>Treponema sp.</i>	<i>Aggregatibacter paraphrophilus</i>
<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Leptotrichia sp.</i>	<i>Pyramidobacter piscolens</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Actinomyces sp. HOT 171</i>	<i>Prevotella oris</i>	<i>Leptotrichia sp. HOT 212</i>
<i>Kingella oralis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
<i>Bergeyella sp. HOT 322</i>	<i>ss.polymorphum</i>	<i>Prevotella oulorum</i>
<i>Fusobacterium nicleatum ss.</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Aggregatibacter sp. HOT 458</i>
<i>Animalis</i>	<i>Treponema sp.HOT 237</i>	<i>Prevotella denticola</i>
		<i>Fusobacterium nucleatum ss.</i>
		<i>vincentii</i>
		<i>Actinomyces sp. HOT 170</i>
		<i>Saccharibacteria (TM7) [G-1] sp. HOT 347</i>

TABLA 1. BACTERIAS INVOLUCRADAS EN LAS DIFERENTES CONDICIONES PERIODONTALES.

## Otros factores relacionados a enfermedad periodontal

### **2.1.2.1. *Tabaquismo.***

A pesar de que la enfermedad periodontal se considera multifactorial, el tabaquismo constituye uno de los factores ambientales que más influyen en la susceptibilidad del individuo a desarrollar la enfermedad. Se ha comprobado la importancia del tabaco, no solo como uno de los principales factores de riesgo para el desencadenamiento y progresión de ésta enfermedad; sino también como un impedimento a una respuesta normal al tratamiento.(4)

Análogamente a lo que ocurre a nivel de la salud en general, el tabaco provoca efectos adversos graves en la cavidad bucal, en particular en los tejidos periodontales. (1) Observaciones señalan que los fumadores presentan una respuesta inflamatoria retardada o disminuida, lo que parece deberse al efecto a largo plazo de la nicotina en la inflamación y no a su efecto vasoconstrictor local, como se creía antes.

Uno de los mecanismos por los cuales el tabaco puede intervenir en la patogénesis de la enfermedad periodontal es modificando la capacidad de defensa del organismo. En relación a la primera línea de defensa, Kenny y sus colaboradores, han observado que los neutrófilos de los fumadores presentaban una menor capacidad de fagocitosis y una menor viabilidad .El tabaco perjudica no solo la fagocitosis sino otras funciones de los polimorfonucleares, como la quimiotaxis, la producción del inhibidor de la proteasa, la generación de superóxido y peróxido de hidrógeno, y la expresión de moléculas de adhesión, trayendo como consecuencia una actividad defensiva deficiente y una mayor destrucción tisular. (2, 5)

### **2.1.2.2. *Dieta y nutrición***

Se sabe que la nutrición y la dieta afectan la salud oral y viceversa, es decir, el estado de la cavidad oral afecta la capacidad de una persona para consumir una dieta adecuada y, por lo tanto, es más difícil alcanzar un equilibrio nutricional. La salud oral y la dieta interaccionan de muchas maneras, por ejemplo, la nutrición influye en el desarrollo craneofacial, la salud de la mucosa oral y los tejidos periodontales relacionándose con la influencia en la aparición de enfermedades

dentales y periodontales. Existen deficiencias de macro y micronutrientes que se relacionan con la enfermedad periodontal, dentro de los cuales encontramos los lípidos, el calcio y vitaminas como la A y D. (6)

### **2.1.2.3. Factores genéticos**

Las enfermedades complejas como la periodontitis son típicamente poligénicas, es decir múltiples genes se consideran “genes modificadores de la enfermedad”. Se estima que para la periodontitis hay entre 10 y 20 genes modificadores, sin embargo hay que considerar que el número y tipo de genes modificadores de la enfermedad para la misma condición puede no ser iguales para diferentes formas de periodontitis; su efecto también está influido por factores ambientales (interacción gen-medio ambiente).

Existe evidencia de que polimorfismos en los genes IL1B, IL1RN, FccRIIIb, VDR y TLR4 pueden estar asociados con la periodontitis agresiva y polimorfismos en los genes ILB1, IL1RN, IL6, IL10, VDR, CD14, TLR4 y MMP1 podrían estar asociados con la susceptibilidad a la periodontitis crónica como un factor único en algunas poblaciones. Sin embargo, muchos de los resultados no han sido replicados en estudios de cohorte con más de cien participantes, lo que disminuye la validez de los resultados. (6)

### **2.1.2.4. Enfermedades sistémicas**

Como se mencionó anteriormente existe evidencia científica que vincula la enfermedad periodontal con otras enfermedades, principalmente se ha estudiado la relación con diabetes, enfermedades cardiovasculares y respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

#### **2.1.2.4.1. DIABETES.**

Engelbreton et al., en 2006 examinaron los niveles de  $\beta$ -glucuronidasa e interleucina 8 en el líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis, con y sin diabetes mellitus (DM) tipo 2 y señalaron que una respuesta local inadecuada

en la que los neutrófilos eran incapaces de migrar a través del revestimiento epitelial por alteración en su capacidad de adherencia o el no poder desgranularse en el sitio, sería la explicación la alteración en los tejidos periodontales.

Los resultados del estudio sugieren que la diabetes mellitus aumenta las probabilidades de aparición, progresión y gravedad de la enfermedad periodontal. Se estima que la prevalencia de periodontitis en pacientes con diabetes es dos, o incluso tres, veces más alta que en una población por lo demás sana. Además, los estudios diferencian a los pacientes con DM que tienen un buen control glucémico y en los que no lo tienen, siendo estos últimos el grupo con mayor riesgo a periodontitis. (7)

#### 2.1.2.4.2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

La EP y las enfermedades cardiovasculares (ECV) son afecciones inflamatorias crónicas que se asocian epidemiológicamente con que ambas tienen una etiología polimicrobiana. Los posibles vínculos entre periodontitis y ECV son investigados por su potencial asociación y causalidad. Entre los factores de riesgo comunes para estas enfermedades se incluyen: el tabaquismo, la diabetes mellitus y la obesidad. Los estudios observacionales revisados hasta la fecha apoyan la teoría de una asociación entre la periodontitis y las ECV, pero no respaldan una relación causal directa entre ellas. Sin embargo existe justificación epidemiológica para señalar que los pacientes con periodontitis tienen un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular en el futuro. (8)

#### 2.1.2.4.3. ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

La asociación entre EP y las enfermedades respiratorias se ha establecido por la aspiración prolongada de microorganismos periodontales desde la orofaringe hacia la vía aérea inferior. Uno de los principales patógenos relacionados con la severidad y progresión de la EP es *Porphyromonas gingivalis*, una bacteria que se ha encontrado en el esputo de pacientes con EPOC. Esto se ha comprobado debido al aumento de anticuerpos anti-*P. gingivalis* en pacientes con mayor frecuencia de episodios de exacerbación. Además, se ha observado

que el tratamiento de la EP reduce la carga microbiológica, lo que ha sido relacionado con una mejoría en la función pulmonar de los pacientes. Teniendo en cuenta lo anterior, se considera a la falta de higiene oral un factor de riesgo para el empeoramiento, complicaciones y severidad de enfermedades que involucran las estructuras anatómicas de vías aéreas como el EPOC o incluso el cáncer pulmonar. (9)

## **2.2. CÁNCER DE PULMÓN**

El cáncer de pulmón (CP) es la principal causa de muerte relacionada con cáncer para ambos sexos. En 2018 se registraron 9.6 millones de muertes por cáncer de los cuáles 1.76 millones fueron debido a CP. De acuerdo con estadísticas de GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) México cuenta con 190,667 casos de cáncer al año entre los cuales, 7811 corresponden a CP. En cuanto a mortalidad, tan sólo en 2016, 7044 muertes fueron a causa de esta afección, colocando a este tipo de cáncer como la neoplasia con mayor tasa de mortalidad en México y en el mundo. (10)

### **2.2.1. Factores de riesgo.**

Debido al aumento en cifras de mortalidad a causa de CP, a principios de los años 90s, se iniciaron estudios tratando de relacionar el tabaquismo y el cáncer de pulmón, (11) encontrándose como principal factor de riesgo (12) . En México se considera que 30 millones de personas, fumadores pasivos y activos, están expuestas a humo de tabaco ambiental (HAT), el cual es una mezcla de componentes tóxicos e irritantes, así como de sustancias cancerígenas. (13)

Otras exposiciones peligrosas entre la población son los combustibles de biomasa. La biomasa está definida como el grupo de materiales biológicos (organismos vivos, animales y vegetales, y sus derivados) que están presentes en un área específica. (14) La madera (leña) es una biomasa importante en México debido a que sigue

siendo la principal fuente de energía de los hogares rurales. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) reportaron que la exposición al humo de leña fue el principal factor de riesgo de cáncer pulmonar en población no fumadora. (15)

Desde el punto de vista genético, algunos estudios han reportado que los pacientes que tienen familiares de primer grado, padres, hermanos o hijos con cáncer de pulmón tienen un mayor riesgo a desarrollar esta enfermedad. (16)

#### 2.2.2. Clasificación Histopatológica.

La clasificación celular de CP se divide en dos tipos, cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

El CPCP constituye cerca de 15 % de los carcinomas pulmonares y en la clasificación actual, incluye al carcinoma de células pequeñas y al carcinoma de células pequeñas combinado (es decir, CPCP combinado con componentes neoplásicos escamosos o glandulares).

El CPCNP es el más frecuente e incluye a todos los tipos de cáncer epitelial de pulmón excepto los de células pequeñas, por ejemplo: el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma. Existen otros tipos menos frecuentes y variantes histológicas poco comunes en todos los tipos. (12)

#### 2.2.3. Estadificación

La clasificación TNM fue creada por Denoix PF en 1943 (17), a través de los años ha sido modificada con la nueva información obtenida, teniendo como resultado la octava edición publicada en 2018 con la que en la actualidad se estadifica el CP. (18) La estadificación de cáncer de pulmón está basada en tres criterios clínicos principales: T (tumor primario), N (nódulos/ganglios linfáticos), M (metástasis). La descripción completa de la estadificación puede revisarse en el Anexo 1.

## 2.3. MICROBIOMA.

### 2.3.1. Definición

El microbioma y el cuerpo humano constituyen un superorganismo integrado, que es el resultado de millones de años de coevolución con adaptación mutua e integración funcional, y confiere importantes beneficios de forma simbiótica. (19)

La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, arqueas, virus, hongos y protistas), que residen en nuestro cuerpo. A veces se confunde con el término microbioma, que es mucho más amplio y hace referencia al conjunto de esas comunidades microbianas incluyendo sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales que les rodean. Estos ecosistemas microbianos se encuentran en el tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio, la cavidad oral y nasofaríngea, y la piel. (20)

### 2.3.2. Microbioma oral

La cavidad bucal humana cuenta con el segundo microbioma más diverso del cuerpo humano, seguido del intestinal, albergando a más de 700 especies de bacterias, virus, hongos y protozoos. La mayoría de los microbios orales son especies comensales, pero también se encuentran presentes patógenos oportunistas.

La temperatura normal de la cavidad oral es en promedio 37°C que proporciona a las bacterias un ambiente estable para sobrevivir; la saliva cuenta con un pH de 6.5-7, el cual es favorable para la mayoría de las especies bacterianas, también las mantiene hidratadas y sirve como medio para el transporte de nutrientes a microorganismos. (20)

Las mucosas bucales y palatinas son áreas con baja diversidad microbiana, sin embargo la lengua cuenta con algunos espacios anatómicos formados por las papilas en donde se crea un ambiente anaeróbico, debido a esto la microflora se vuelve más diversa ya que incluye microorganismos anaerobios obligados como son *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Treponema*. En cuanto a otras estructuras capaces de crear ambientes donde la colonización de este tipo de bacterias se lleva a cabo de forma favorable, se encuentra los dientes y la encía,

que permiten que grandes masas de microbios se acumulen como biopelículas conocidas como biofilm.

La disbiosis es el desbalance del equilibrio microbiano de la microbiota normal, debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, a cambios en su distribución. (19) Se ha sugerido que la disbiosis oral conduce a enfermedades tanto locales como sistémicas. La inflamación disbiótica, en particular, parece preceder a las enfermedades crónicas a través de redes de señalización defectuosas o mejoradas. Se supone que la inflamación protege contra infecciones y lesiones y, en última instancia, promueve la reparación y regeneración de los tejidos. Sin embargo, la inflamación sostenida de bajo grado que no se resuelve puede progresar a afecciones crónicas como enfermedad periodontal, trastornos cardiovasculares y cáncer. (21)

### 2.3.3. Microbioma oral y cáncer

La asociación de *Helicobacter pylori*, que se define como carcinógeno de clase I, con cáncer gástrico es la relación mejor estudiada entre una infección bacteriana y el cáncer. Ahora se reconoce que otros patógenos bacterianos en humanos y roedores tienen un papel directo en la carcinogénesis.(22) Se han descrito distintos mecanismos para explicarlo. El primero tiene que ver con los mediadores inflamatorios provocados por las bacterias, que causan o facilitan la proliferación celular, mutagénesis, activación de oncogenes y angiogénesis. El segundo, la influencia de las bacterias en la carcinogénesis a través de la secreción de proteínas efectoras bacterianas, utilizando sistemas de secreción tipo 3 o tipo 4 (T3SS / T4SS), lo que podría afectar la proliferación celular, los reordenamientos del citoesqueleto, la activación de NF-KB y la inhibición de la apoptosis. El tercer mecanismo, explica que las bacterias pueden producir algunas sustancias cancerígenas, como la conversión bacteriana de etanol a acetaldehído (un carcinógeno reconocido).



Mager y col. Probaron diferencias en especies bacterianas orales de un grupo de individuos libres de cáncer y de un grupo de sujetos con carcinoma oral de células escamosas (COCE). Los niveles de tres especies (*Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* y *Streptococcus mitis*) estaban elevados en la saliva de pacientes que padecían COCE. Estas tres especies bacterianas se sugirieron como marcadores de diagnóstico y fueron encontrados para predecir el 80% de los casos de cáncer. (23)

Las bacterias orales también se detectan en tumores fuera de la cavidad bucal y aparecen en los pacientes con cánceres colorrectal y pancreático. En los casos de cáncer colorrectal, dos especies son especialmente prominentes: *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Una gran abundancia de *Fusobacterium* (en particular *F. nucleatum*) en sitios de cáncer colorrectal se ha asociado con metástasis en los ganglios linfáticos regionales y localización del tumor (2% en recto y aproximadamente 11% en ciego). En los cánceres de páncreas, además de *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*, cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Neisseria elongata* y *Streptococcus mitis* han sido descritos. Se informa que están presentes bacterias orales de los géneros *Capnocytophaga* y *Veillonella* en cantidades mayores en pacientes con cáncer de pulmón. Las bacterias orales que se han identificado como biomarcadores de cáncer se muestran a continuación (Tabla 2). (23)

Localización de cáncer	Bacterias orales como biomarcadores	Hallazgos principales
Carcinoma oral de células escamosas (COCE)	<i>Streptococcus anginosus</i>	La infección por <i>S. anginosus</i> es más común en COCE
Carcinoma oral de células escamosas (COCE)	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Streptococcus mitis</i>	Los niveles de las bacterias mencionadas se elevaron en la saliva de los pacientes con COCE
Carcinoma oral de células escamosas (COCE)	Bacilo, <i>Enterococcus</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Slackia</i>	Diferencias significativas entre la lesión precursora epitelial y el cáncer los pacientes en presentaron cinco géneros bacterianos
Carcinoma oral de células escamosas (COCE)	<i>Streptococcus sp. 058</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>Peptostreptococcus stomatis</i> , <i>Gemella hemólisis</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>Johnsonella ignava</i>	Las bacterias presentadas estaban altamente asociadas con los sitios tumorales de COCE

Carcinoma oral de células escamosas (COCE)	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Los altos recuentos salivales de las bacterias estudiadas pueden ser diagnósticos. indicadores de carcinoma oral de células escamosas
Carcinoma de células escamosas gingival	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> estaba abundantemente presente en el epitelio oral maligno.
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)	<i>Streptococcus sp.</i> y <i>Lactobacillus sp.</i>	Las muestras de saliva de HNSCC se asociaron con mayores cantidades de <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i> y disminución de <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Gemella</i> y <i>Aggregatibacter</i>
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)	<i>Streptococcus anginosus</i>	La infección por <i>S. anginosus</i> está implicada en la carcinogénesis de HNSCC
Carcinoma de células escamosas queratinizante	<i>Veillonella sp.</i> , <i>Fusobacterium sp.</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>Porphyromonas sp.</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>Haemophilus sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> Y <i>Enterobacterias</i>	Mayor número de bacterias presentadas en escamosas queratinizantes carcinoma de células
Cáncer orodigestivo	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> es un biomarcador del riesgo de muerte asociado a microbios debido a cáncer orodigestivo
Cáncer de esófago	<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Treponema denticola</i>	Las bacterias estudiadas podrían tener un papel importante en los agentes cancerígenos. proceso provocando inflamación y promoviendo la carcinogénesis
Adenocarcinoma de esófago y esófago carcinoma de células escamosas	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i>	La abundancia de <i>P. gingivalis</i> tiende con un mayor riesgo de carcinoma de células escamosas de esófago y <i>T.forsythia</i> se asocia con mayor riesgo de adenocarcinoma de esófago
Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium sp.</i> , <i>Porphyromonas sp</i>	Se encontró un mayor transporte de las bacterias presentadas en pacientes con CRC; menor abundancia de <i>Clostridium sp.</i> fue observado simultáneamente
Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium sp.</i>	El enriquecimiento de <i>Fusobacterium</i> está asociado con subconjuntos moleculares específicos de los cánceres colorrectales
Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>Fusobacterium sp.</i> están enriquecidos en adenomas colónicos humanos. <i>F.nucleatum</i> aumenta la multiplicidad tumoral y puede promover progresión del tumor
Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Los pacientes con niveles bajos de <i>F.nucleatum</i> tuvieron una mayor tiempo de supervivencia que los pacientes con niveles moderados y altos de la bacteria
Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium sp.</i>	La sobreabundancia de <i>Fusobacterium</i> en el tumor tiene asociación positiva con metástasis en los ganglios linfáticos
Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium sp.</i>	Las secuencias de <i>Fusobacterium</i> se enriquecieron en CCR

Cáncer colorrectal (CCR)	<i>Fusobacterium sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i>	Las bacterias presentadas exhibieron una mayor abundancia en los tejidos cancerosos, mientras que <i>Pseudomonas</i> y <i>Escherichia-Shigella</i> se redujeron
Cáncer de páncreas	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Los individuos con altos niveles de anticuerpos contra <i>P. gingivalis</i> tenían un mayor riesgo de cáncer de páncreas
Cáncer de páncreas	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	El transporte de ambos patógenos se asoció con un mayor riesgo de cáncer de páncreas
Cáncer de páncreas	<i>Fusobacterium sp.</i>	El nivel de especies de <i>Fusobacterium</i> en el tumor se asocia con un peor pronóstico del cáncer de páncreas
Cáncer de páncreas	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Neisseria elongata</i>	Las bacterias se pueden utilizar como biomarcadores para distinguir a los pacientes con cáncer de páncreas de sujetos sanos
Cáncer de pulmón	<i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Veillonella sp.</i>	Los niveles de bacterias presentadas fueron significativamente más altos en la saliva de pacientes con cáncer de pulmón.

TABLA 2. BACTERIAS ORALES COMO BIOMARCADORES DE TIPOS ESPECÍFICOS DE CÁNCER

## 2.4. ENFERMEDAD PERIODONTAL Y CÁNCER.

Aunque fumar se considera la principal causa de cáncer de pulmón, el 15% de hombres y el 53% de mujeres con esta enfermedad se identifican como no fumadores, esto ha llevado a que otros factores de riesgo importantes para el desarrollo y evolución de dicha patología sean estudiados a profundidad. Como se mencionó anteriormente existe evidencia de la importancia del microbioma oral respecto al cáncer, ahora ¿Cómo relacionamos la enfermedad periodontal con el cáncer de pulmón? Ambas patologías tienen una epidemiología importante, tanto en México como en el mundo, dentro de este rubro encontramos que algunos factores de riesgo son compartidos, como el tabaquismo y la dieta. No conforme, la enfermedad periodontal, una inflamación crónica, podría fomentar un ambiente favorable para la carcinogénesis, los impactos microbianos en el metabolismo del huésped y la genotoxicidad, no sólo de la cavidad bucal, si no en sitios anatómicos cercanos, como los pulmones. Las bacterias involucradas en esta inflamación, producida en boca, podrían ser transportadas por medio de microaspiraciones de flúidos orales a los pulmones, explicando así la relación que existe entre estas dos

enfermedades. (21) Con toda esta información se han realizado diversas investigaciones en la que los hallazgos más importantes fueron:

- El medio ambiente en los pulmones podría ser un factor causante de cáncer. Se demostró que la mayoría de las bacterias presentes en los pulmones también están presentes en la cavidad bucal, lo que sugiere el microbioma oral como fuente clave del microbioma pulmonar. (24)
- Yan et al., encontraron recuentos significativamente más altos de especies de *Capnocytophaga* y *Veillonella* en la saliva de pacientes con cáncer de pulmón. (25)
- Un estudio en 2016 sobre patógenos periodontales en mujeres posmenopáusicas afirmó una relación entre los patógenos del complejo naranja ( *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus* ) y el cáncer de pulmón. (19)
- Yoon HS y col. Informaron la asociación de la pérdida de dientes, caries y antecedentes de enfermedades periodontales con aumento del riesgo de cáncer de pulmón en una población afroamericana de bajos ingresos. (26)

Los hallazgos de estos diferentes estudios sugieren la asociación de ciertas bacterias con el desarrollo y evolución del cáncer de pulmón. Describiendo así la importancia del microbioma oral en la etiología de este tipo de cáncer. Por lo tanto, los enfoques que mantienen la salud bucal y la simbiosis del microbioma bucal podrían reducir la incidencia de cáncer de pulmón y mejorar la evolución del mismo y no sólo eso, podría encontrarse un microorganismo específico que ayude a diagnosticar cáncer pulmonar en estadios más tempranos en pacientes con alto riesgo a padecerlo.

## **2.5. SALIVA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO.**

### 2.5.1. Saliva

La saliva es un líquido excretado por las glándulas salivales y es uno de los factores más importantes que participan en la homeostasis de la cavidad oral. La composición y consistencia depende de la glándula de la que se secreta, existen 3: parótida, sublingual y submandibular. Así como la edad, género y tipo de factor estimulante. La saliva humana está compuesta principalmente de agua (94-99%), y aún así existe una importante fracción que está formada por proteínas (especialmente glicoproteínas) y lípidos. La saliva también es rica en carbohidratos, sales y nitrógeno no proteico (urea, ácido úrico, aminoácidos y creatinina). Además de la excreción glandular, la saliva también está conformada por líquido crevicular gingival, células epiteliales, leucocitos, bacterias y metabolitos bacterianos.

La saliva de la mucosa oral contiene hasta 10<sup>8</sup> microorganismos por mililitro a demás de nutrientes favorables para el crecimiento microbiano.

Los adultos secretan alrededor de 0,5 a 1 litro de saliva al día y se ha demostrado que los cambios cuantitativos y cualitativos en la saliva pueden verse afectados por una variedad de enfermedades orales y sistémicas. (27)

### 2.5.2. Biomarcadores salivales.

La saliva contiene muchos marcadores para enfermedades que reflejan el estado de salud no solo de las glándulas salivales y la cavidad bucal, sino también de otras partes del cuerpo. La saliva contiene marcadores de enfermedades que se encuentran también en sangre, como anticuerpos e interleucinas, que pueden aplicarse en la detección de cambios patológicos tempranos, por ejemplo: enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones bacterianas, virales y por hongos. (24)

La saliva puede considerarse un excelente método diagnóstico para investigaciones científicas, incluso desde un punto de vista ético. Es un método de recolección no

invasivo y gracias a su fácil obtención, la frecuencia con la que puede realizarse una toma de muestra hace viable la repetición de análisis durante el seguimiento de pacientes. Este fluido no coagula, es estable para fines de diagnóstico hasta 24 hrs a temperatura ambiente y durante una semana a 4°C. (28) El hecho de que la recolección de saliva se lleve a cabo de manera más sencilla, comparada con la extracción de sangre, hace posible una mayor participación en estos tipos de estudios, diagnósticos más tempranos y además disminución en el gasto del presupuesto para las instituciones de salud.

La revisión de la literatura sugiere que la saliva se ha empleado con éxito en el diagnóstico de muchas enfermedades sistémicas y diagnósticos toxicológicos tales como:

- Enfermedades endocrinas: Diabetes tipo 1 y 2, Síndrome de Cushing. (29)
- Enfermedades autoinmunes: Síndrome de Sjörger, Enfermedad Celiaquía y Tiroiditis de Hashimoto. (30)
- Enfermedades infecciosas: VIH, hepatitis viral y paludismo. (31)
- Enfermedades del tracto gastrointestinal: Reflujo gastroesofágico. (31)
- Diagnósticos toxicológicos: Las concentraciones de drogas en la saliva se correlacionan con las concentraciones de fármaco en sangre. (32)
- Exposición ambiental a los fluoruros. (32)
- Cánceres: De ovario, pulmón, mama y páncreas. (33)

Además los microorganismos salivales están siendo cada vez más estudiados como métodos diagnóstico de biomarcadores en cánceres orales. Guerrero-Preston y col. sugieren que los aumentos en la abundancia relativa de varios géneros bacterianos (*Selenomonas*, *Streptococcus* y *Treponema*) se encuentran más abundantes en la saliva de pacientes con cáncer, en comparación con controles sanos. En conclusión, la saliva es un excelente material para detecciones bioquímicas y toxicológicas, diagnósticos de la cavidad bucal y enfermedades sistémicas. (33)

## 2.6. GENÉTICA BACTERIANA.

La capacidad infecciosa de bacterias patógenas se debe a que poseen la información génica necesaria para la colonización de los tejidos del huésped y producir sustancias tóxicas que causan enfermedad. En el microbioma oral, por ejemplo, el 30% de las bacterias se han clasificado como no cultivables, por lo que el conocimiento generado a partir de estudios de genética bacteriana ayuda a elaborar clasificaciones taxonómicas más específicas, además de contribuir enormemente a comprender los mecanismos de regulación de la expresión génica, entre otros aspectos.

Las bacterias potencialmente patógenas para la especie humana son capaces de comportarse como tales cuando portan un plásmido que contiene genes específicos para producir enfermedad. Un gen se define como un segmento de ADN que posee información necesaria para generar moléculas con función biológica. (34) Por ejemplo, genes que codifican enzimas capaces de degradar antibióticos, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de los mismos.

Hebert *et al.* con la intención de obtener una herramienta estandarizada para la identificación de organismos, generaron un método rápido, confiable y reproducible, basado en la amplificación de una región estandarizada del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), éste método ha sido una excelente herramienta para estudios taxonómicos y/o filogenéticos en microorganismos. (35)

Aunque se sugirieron varias regiones o genes, el ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S), ha sido una buena opción para la clasificación de bacterias. (35)

### 2.6.1. Gen ARNr 16 S

Existen múltiples estrategias para el uso del gen 16S como herramienta de identificación de microorganismos presentes en comunidades microbianas; esta

identificación puede realizarse a través de la secuencia completa del gen o bien una o varias de las regiones hipervariables. El 16S contiene nueve regiones hipervariables (V1–V9) en estas se encuentra información útil para estudios de filogenética y taxonomía. Mediante algunos análisis se ha determinado que el segmento que incluye las regiones V4/V5 es el más eficiente para la clasificación del microbioma.(35)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias que juegan un papel importante en la patogenia de la enfermedad periodontal y pueden trasladarse a través de micro aspiraciones a otros sitios anatómicos conectados, como el pulmón en donde pueden propiciar un ambiente favorable para el desarrollo o agravamiento del cáncer pulmonar. Se ha observado que el microbioma pulmonar en pacientes con cáncer es diferente y puede ser proveniente del microbioma oral. El 30% de estas bacterias están clasificadas como no cultivables, es por ello que establecer perfiles microbianos por medio de secuencias genéticas ayudarán a obtener una clasificación taxonómica más amplia y precisa para un mejor análisis, así también la recolección de muestras que requiere este método es favorable para las condiciones en las que los sujetos de estudio puedan encontrarse.

Con base en esto se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿El perfil bacteriano salival respecto a enfermedad periodontal de pacientes con adenocarcinoma pulmonar es diferente al de pacientes libres de cáncer?

### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia epidemiológica de ambas patologías el establecer y describir la relación existente, ayudaría a generar diagnósticos de cáncer en estadios tempranos, tomando en cuenta que la mayor parte de estos diagnósticos se realizan en etapas de la enfermedad muy avanzados. Se ha sugerido que los



enfoques que mantienen la salud bucal y la simbiosis del microbioma bucal podrían reducir la incidencia de cáncer de pulmón y mejorar la evolución del mismo.

## 5. HIPÓTESIS

Los recuentos de bacterias periodontopatógenas serán más elevados en pacientes con adenocarcinoma pulmonar en comparación a pacientes libres de cáncer.

## 6. OBJETIVOS

### *4.1. Principal*

Comparar perfiles bacterianos específicos de enfermedad periodontal a través del análisis del gen 16S en muestras de saliva de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y pacientes libres de cáncer

### *4.2. Específicos.*

1. Realizar un análisis genético a través de secuenciación del gen 16S de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sujetos libres de cáncer pareados por edad y sexo.
2. Identificar los perfiles bacterianos periodontopatógenos en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y sujetos sin dicha patología.
3. Comparar las diferencias taxonómicas de los perfiles bacterianos de casos y controles.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio fue de tipo observacional retrospectivo de casos y controles.

Para la fase de descubrimiento se seleccionaron 22 casos y 24 controles del banco de muestras de saliva del Laboratorio de Genómica Clínica, en este biobanco se cuenta hasta el momento con un total de 403 muestras de las cuales 102 corresponden a sujetos fumadores sin cáncer, 96 a fumadores con cáncer, 94 a no fumadores sin cáncer y 111 fumadores con cáncer.

Las muestras fueron colectadas en el Instituto Nacional de Cancerología, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga y clínica de Tabaquismo de la Facultad de medicina de la UNAM, previa firma del consentimiento informado (ver anexo 2). Al momento de la colección de la muestra se llenó cuestionario estructurado que incluyó datos sociodemográficos, antecedentes heredofamiliares, así como variables relacionadas con la enfermedad de interés (ver anexo 3).

### 7.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

#### 7.2.1. Criterios de inclusión.

Casos	Controles
Sexo: Masculino o femenino	Sexo: Masculino o femenino
Edad: Mayores de 18 años	Edad: Mayores de 18 años
Diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma pulmonar	Sin diagnóstico previo de adenocarcinoma pulmonar
Sin tratamiento previo	
Cualquier estadio	

### 7.2.2. Criterios de exclusión

- No desear participar en el estudio.
- Patologías en glándulas salivales.
- Pacientes que tomen medicamentos que afecten al flujo salival.

### 7.2.3. Criterios de eliminación.

- No desear continuar en el estudio.
- Falta de datos o firma en la hoja de recolección o consentimiento informado.
- Concentraciones insuficientes de ácidos nucleicos (mínimo 5ng).
- ADN bacteriano con menos de 500pb (integridad en geles de agarosa).
- Bajo número de lecturas en análisis bioinformático.

## 7.3. Flujo de trabajo para el desarrollo experimental del proyecto



ILUSTRACIÓN 1. METODOLOGÍA

Los protocolos que se emplearon para el desarrollo metodológico de este estudio se muestran en el anexo 4.

#### **7.4. Estadística descriptiva y comparativa.**

La estadística de las variables de importancia se llevó a cabo en el software Rstudio (36) con comandos básicos y paquetes especializados como: car (37), abind y Rcmdr.

- Para variables cualitativas: Prueba exacta de Fisher y Chi cuadrada.
- Para variables cuantitativas: T Student y U de Mann-Whitney.

## **8. RESULTADOS.**

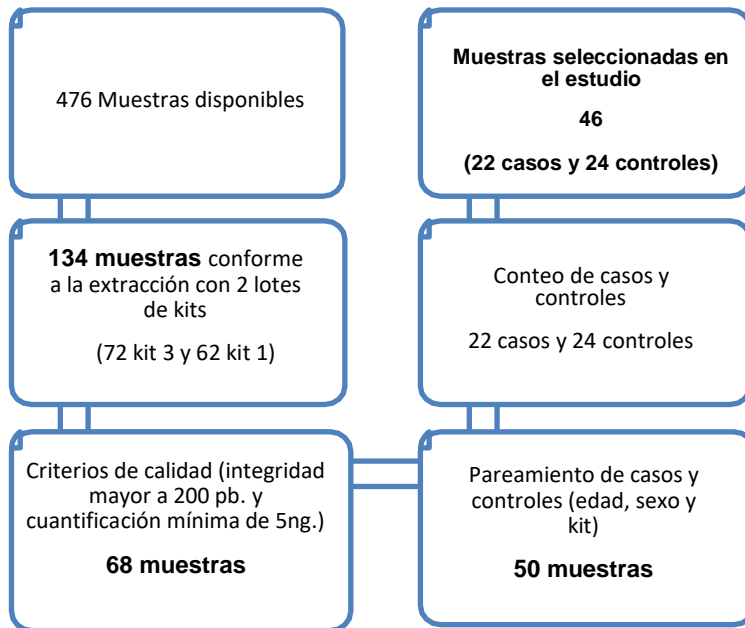
### **7.1 Descripción de la población.**

Para la selección de las muestras para la primera fase de descubrimiento, se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

1. Se realizó extracción de ADN bacteriano de todas las muestras del biobanco con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma pulmonar y controles sin cáncer.
2. Para el aislamiento del ADN se utilizaron 2 diferentes lotes del kit DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN). De acuerdo con las recomendaciones publicadas los casos y controles deben ser extraídos con el mismo lote del kit, por lo cual se parearon casos y controles de acuerdo con el kit de extracción utilizado.
3. Finalmente, las muestras de ADN con una concentración mayor de 5 ng. y con integridad 1 (íntegro) o 2 (parcialmente íntegro, fragmentos mayores 200 pb).
4. Se eligieron 50 muestras que cumplieron con los criterios previamente descritos para la preparación de librerías para secuenciación.
5. El último filtro de selección de muestras fue mediante el conteo por número de lecturas el cual se llevó a cabo en el

análisis bioinformático se eliminaron 4 muestras, debido a que tenían un diagnóstico diferente a adenocarcinoma pulmonar quedando así un total de 46 muestras 22 casos y 24 controles.

TABLA 3. SELECCIÓN DE PARTICIPANTES.



Una vez seleccionadas las 46 muestras se compararon las características sociodemográficas entre casos y controles. Tomando como referencia el *p-value* o valor de p, que se define como la probabilidad de que un valor estadístico obtenido muestre que no hay diferencia real en la población que se está estudiando. La hipótesis nula consiste en una afirmación acerca de la población de origen de la muestra, cuando el valor de p es < a 0.05 la hipótesis nula se considera falsa y entonces se dirá que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones comparadas. Es con esta medida con la que los casos y controles fueron estudiados en esta parte del proyecto para poder afirmar que estadísticamente sólo serán diferentes en cuanto a padecer o no adenocarcinoma pulmonar.

El análisis de casos y controles mostró que la media de edad en los casos fue de 63.95 teniendo un rango de 34 a 82 años, mientras que en los controles fue de 64.12 y rango de 34-84. En cuanto al sexo en los casos el 54.5% (12), pertenecían al sexo masculino y el 45.5% (10) al sexo femenino, para los controles fue de 54.4% (13) y 45.8% (11) respectivamente.

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en cuanto al nivel educativo, se observa que en el grupo de casos tenemos 3 individuos sin estudios y por el contrario el grupo de controles se encuentran 3 con estudios de posgrado. Estas diferencias se pueden explicar también por el sitio de recolección de las muestras. Las muestras recolectadas en instituciones como el Hospital General de México o el Instituto Nacional de Cancerología, fueron mayormente casos, estos pacientes vienen de otros estados de la república a buscar atención médica cómo se muestra a continuación.

	<b>Casos (22)</b>	<b>Controles (24)</b>	<b>p</b>
<b>Total</b>	22(48%)	24(52%)	
<b>Edad</b>			
Media y desviación estándar	63.95±11.07	64.12±11.14	0.95
Rango	34-82	34-83	
<b>Género</b>			
Masculino	12 (54.5%)	13 (54.2%)	1
Femenino	10 (45.5%)	11 (45.8%)	
<b>Escolaridad</b>			
Sin estudios	3 (13.6%)	0 (0%)	0.21
Primaria	8 (36.4%)	8 (33.3%)	
Secundaria	5 (22.7%)	4 (16.7%)	
Preparatoria	3 (13.6%)	2 (8.3%)	
Profesional	3 (13.6%)	8 (33.3%)	
Posgrado	0 (0%)	2 (8.3%)	
<b>Comorbilidades</b>	8 (40%)	14 (70%)	0.11
<b>Estado fumador</b>			
Nunca fumador	9 (40.9%)	10 (41.7%)	0.93
Ex-fumador	7 (31.8%)	6 (25%)	
Fumador	6 (27.3%)	8 (33.3%)	

<b>Alcoholismo</b>	5 (22.7%)	3 (12.5%)	0.45
<b>Exposición a humo de leña</b>	10 (45.5%)	8 (33.3%)	0.54
<b>Fumador pasivo</b>	12 (54.4%)	7 (29.2%)	0.13
<b>Riesgo paquetes año</b>			
< 30	10 (55.6%)	12 (75%)	0.29
≥ 30	8 (44.4%)	4 (25%)	

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

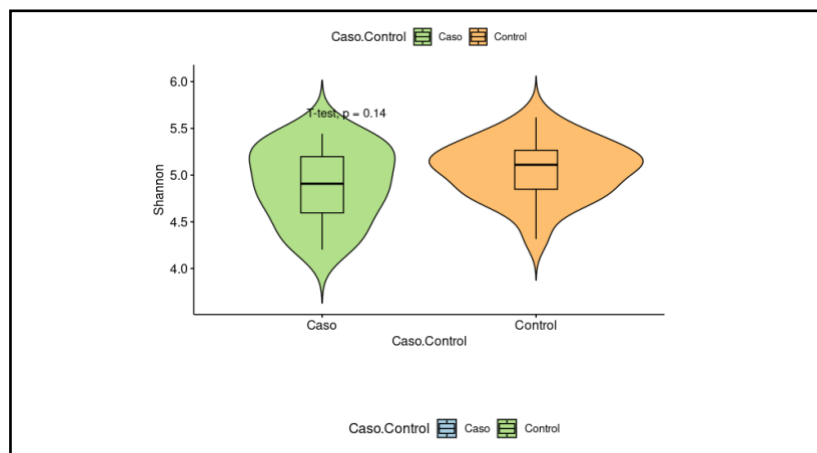
En lo correspondiente a las características clínicas de nuestros casos observamos que el 54.5% (12 pacientes) se encontraban en un estadio IV, seguido de 22.7% (5 pacientes) en estadio III y con el mismo porcentaje los pacientes que no contaban con reporte de estadio. Solo en 3 pacientes se reportó las mutaciones en EGFR y un paciente con mutación en KRAS. (Tabla 4).

<b>Diferenciación</b>		
No mencionado		1 (7.1%)
Moderado		4 (28.6%)
Poco		9 (64.3%)
<b>Estadio</b>		
No reportado		5 (22.7%)
III		5 (22.7%)
IV		12 (54.5%)
<b>Mutación EGFR</b>		3 (17.6%)
<b>Mutación ALK</b>		0 (0%)
<b>Mutación KRAS</b>		1 (5.9%)

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE CASOS

## 7.2 Diversidad alfa (Índices de Shannon y Simpson)

La diversidad alfa se refiere a la riqueza biológica de un determinado hábitat o bien el número de especies en una localidad. Conforme la diferencia entre el grupo con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y el grupo control, respecto a la abundancia y riqueza bacteriana al momento de la asignación taxonómica y la cual se llevó a cabo mediante los índices de Shannon y Simpson indicó que no existe diferencia alguna entre los grupos. El índice de Shannon, que se utiliza para cuantificar la diversidad específica de cada muestra arrojó una  $p=0.14$ . En cuanto a Simpson, índice que mide la diversidad de la comunidad resultó con una  $p=0.29$ .



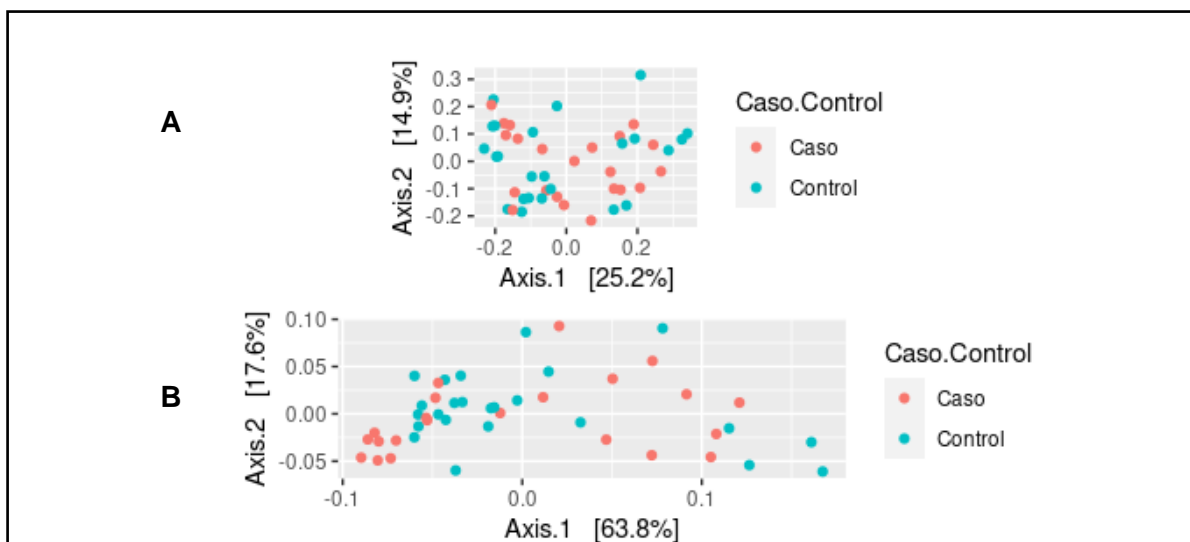


A

B

### 7.3. Diversidad beta (Unifrac ponderado, Unifrac no ponderado y Bray-Curtis)

La diversidad beta, considerada como el recambio de especies de una localidad a otra o bien la riqueza de especies promedio de las localidades de cierta región. Posterior a la diferencia respecto a la riqueza y abundancia se llevó a cabo el análisis de coordenadas Unifrac ponderado, no ponderado y Bray-Curtis, esto con la finalidad de poder encontrar similitudes cuantitativas y cualitativas entre los grupos; No encontrando similitudes entre ellos (casos y controles), ya que no mostraron aglomeraciones específicas entre grupos.



#### **7.4. Perfiles bacterianos de casos y controles (Abundancia relativa).**

La riqueza y abundancia de cada orden taxonómico en proporciones serán representadas por la abundancia relativa. Conforme a la composición taxonómica de las comunidades microbianas a nivel de Filo entre casos y controles encontramos que *Firmicutes* y *Actinobacteriota* fueron más abundantes en ambos grupos; *Firmicutes* con 79.8% en el grupo de casos y 77.6% en el grupo control, mientras que *Actinobacteriota* con 8.8% en casos y 10.6% en controles.

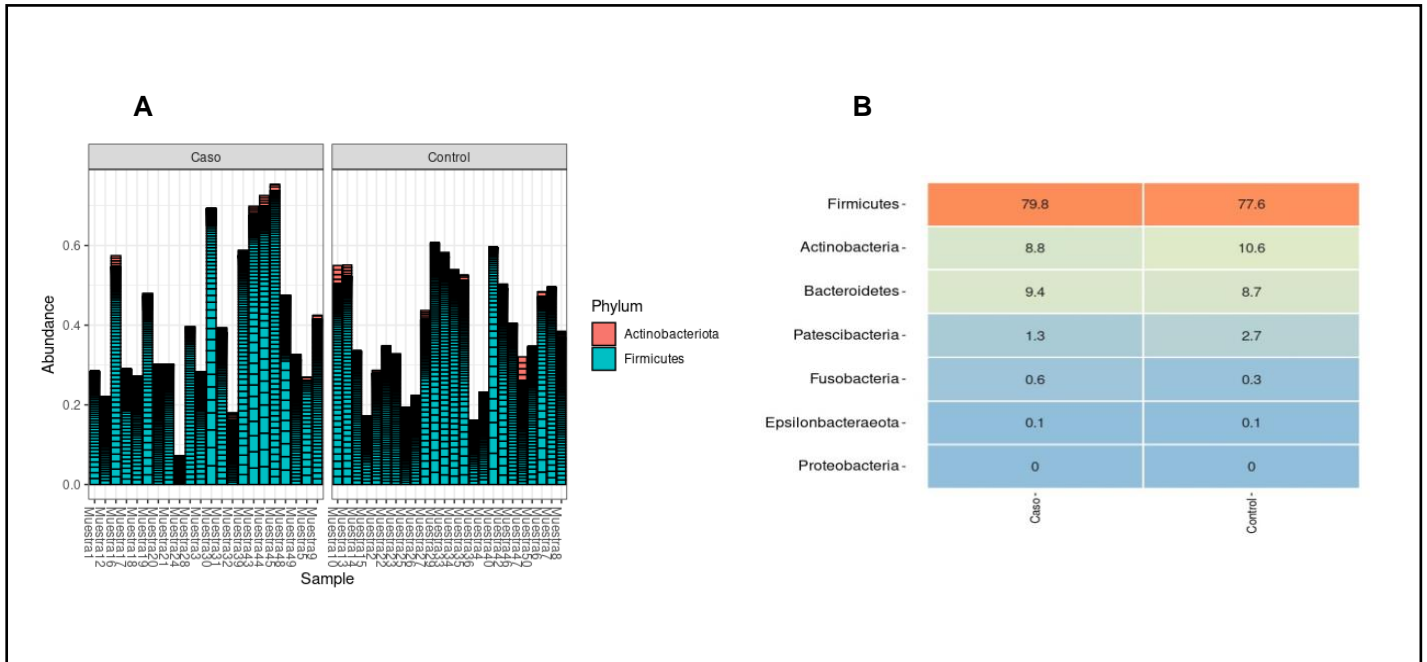
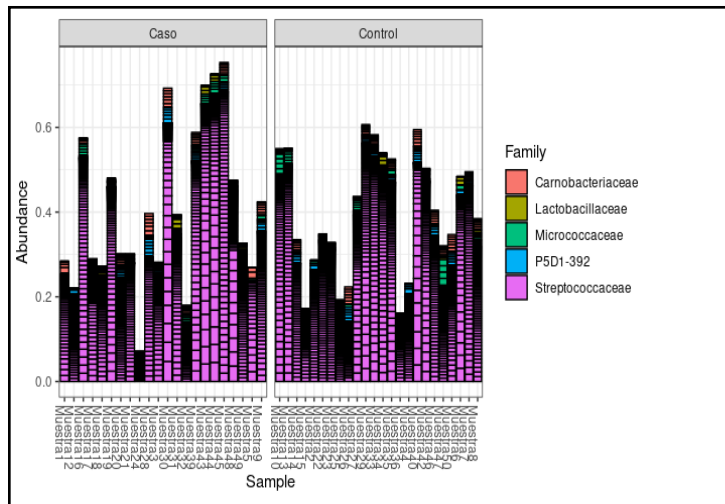


ILUSTRACIÓN 4. ABUNDANCIA RELATIVA A NIVEL DE FILO

Por su parte a nivel de Familia se encontró que *Streptococcaceae* fue más abundante en casos y controles, seguido de *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Carnobacteriaceae*.



## ILUSTRACIÓN 5 ABUNDANCIA RELATIVA A NIVEL DE FAMILIA

A nivel taxonómico de género se encontró a *Streptococcus* con 53.2% en casos y 53% en controles, seguido de *Rothia* con 7.1% y 8.5% respectivamente; Por su parte *Veillonella* mostró el 7% en casos y 7.5% en controles, *Prevotella*, *Gemella*,

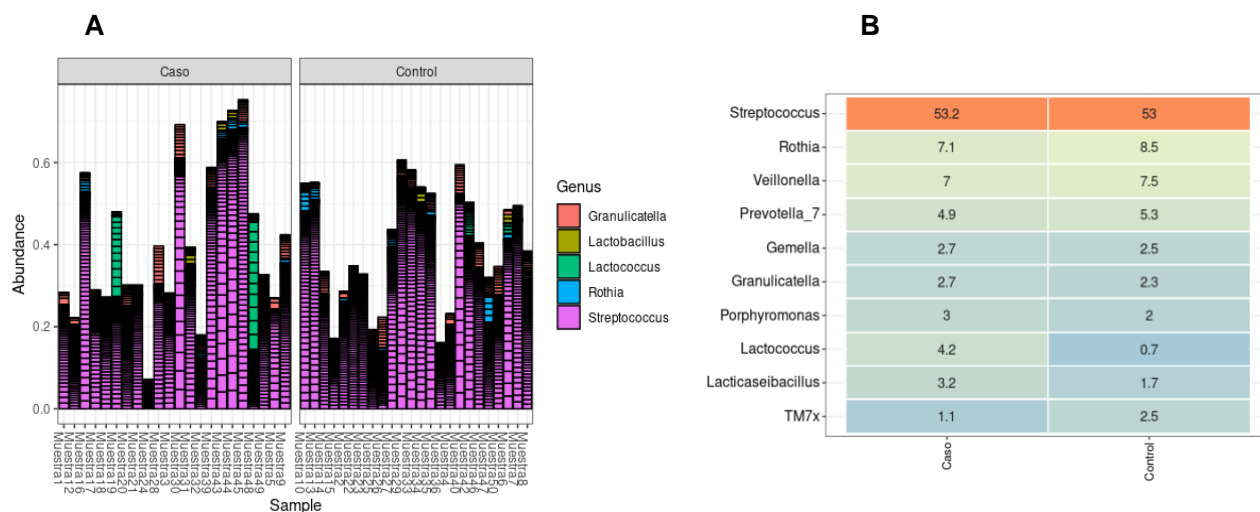
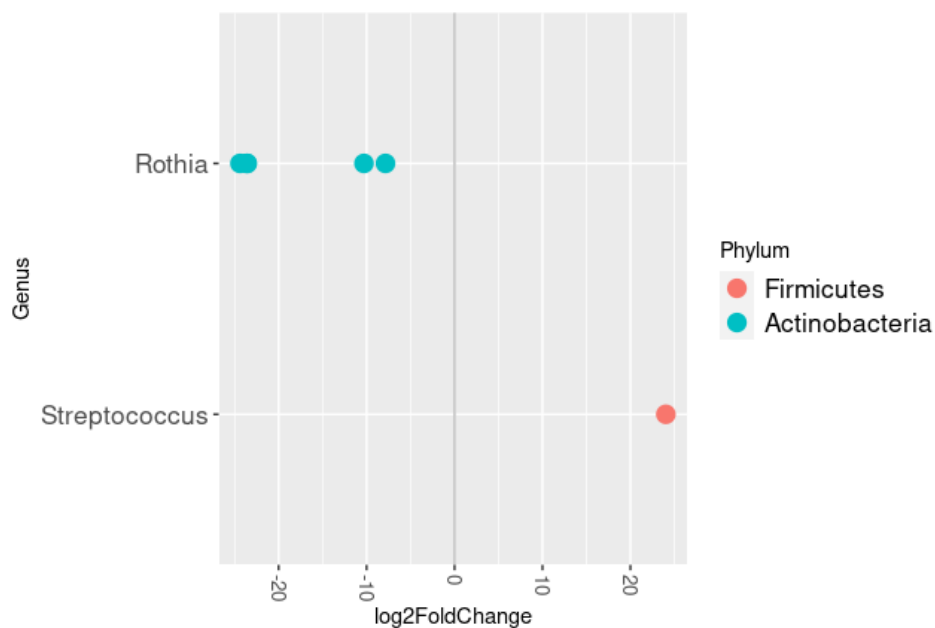


ILUSTRACIÓN 6. ABUNDANCIA RELATIVA A NIVEL DE GÉNERO.

*Granulicatella*, *Porphyromonas* y *Lactococcus* también se encontraron en ambos grupos en menor porcentaje que los géneros mencionados anteriormente.

### 7.5 Diferencia taxonómica casos/controles

Finalmente se realizó la diferenciación taxonómica, tomando en cuenta el valor de *p* ajustado. Se encontró aumentado con diferencia estadísticamente significativa el filo de *Firmicutes* en el grupo con adenocarcinoma pulmonar y disminuido el filo de *Actinobacteria* en el mismo grupo. Por su parte el género de *Streptococcus* también estaba aumentado con diferencia en el grupo de casos y disminuido se observó a *Rothia* con 5 variantes.



## 9. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se realizó la comparación de perfiles bacterianos en diferentes niveles taxonómicos de 46 muestras de saliva, 22 casos con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y 24 controles sin cáncer.

Las bacterias juegan un papel importante en el desarrollo y progresión de patologías como la enfermedad periodontal y el cáncer de pulmón, tanto que incluso se han estudiado de manera conjunta. Autores como Panagiotis A. mencionan que el tabaquismo puede ser un factor confusor al momento de comparar estas dos enfermedades (38), sin embargo, un estudio con 19 933 pacientes no fumadores

demonstró que existen otros factores que explicarían el por qué la enfermedad periodontal se ve asociada al aumento de la incidencia de cánceres relacionados a tabaquismo. (39)

Referente a los filos bacterianos con abundancias relativas elevadas en nuestra población de estudio, se encuentra *Firmicutes*. Este grupo bacteriano comprende tres clases (*Bacilli*, *Clostridia* y *Erysipelotrichia*), 26 familias y 223 géneros, constituyendo así el principal filo bacteriano. Balaji Anitha y cols. realizaron un estudio en pacientes con lesiones periodontales crónicas y agresivas, concluyendo que *Firmicutes* tiene un gran potencial para generar alteraciones en la microbiota bucal, es importante mencionar que profundizar en otros factores podría ayudar a comprender mejor el papel de esta bacteria en la periodontitis (40). Respecto al CP, Xiaochi Sun y cols. en una búsqueda sistemática de la microbiota respiratoria encontraron que *Firmicutes* era más abundante en pacientes que presentaban un diagnóstico de cáncer pulmonar en comparación con otros grupos. (41)

Por otro lado, en estudios de secuenciación se describe a *Actinobacteriota* como uno de los 9 grupos bacterianos más encontrados en placa subgingival. (41) En cuanto al comportamiento que podría estar involucrado en la disbiosis que genera patologías periodontales, se propuso comparar a sujetos con periodontitis agresiva generalizada y se halló que la abundancia de este filo fue mayor en los pacientes sanos. (36) Aunque en algunos resultados se habla de la presencia de *Actinobacteriota* en distintas condiciones periodontales (37), la mayoría coincide en que se encontró en mayor proporción en personas que presentaban tejidos periodontales sanos(42). Con estos datos podríamos explicar porque en nuestro análisis se encontró una mayor abundancia (10.8%) en perfiles bacterianos de los controles en comparación con los casos (8.8%).

Pasando a uno de los géneros más estudiado a nivel oral tenemos a *Streptococcus* (S.). S. resultó ser más del 50% abundante al momento de agrupar a los géneros bacterianos presentes en nuestras muestras, tanto en casos como en controles. Su estudio se ha basado principalmente en su función para la formación del biofilm y el

papel que juega en la disbiosis. M Ni'mah y cols. A través un estudio dedujeron que *Streptococcus mutans* es un biomarcador de riesgo a enfermedad periodontal. (43) Existe evidencia de otras especies, como *S. salivarius*, que es una bacteria capaz de producir moléculas que inhiben la activación de interleucinas encargadas de la mediación inflamatoria de células gingivales, lo cual podría frenar el desarrollo de patologías periodontales. Sin embargo esta molécula no es capaz de impedir el crecimiento de otros patógenos bacterianos. Es decir, esta especie es el ejemplo de que algunas bacterias al ser parte del microbioma oral pueden actuar en favor o en contra de los tejidos periodontales, dependiendo de otros factores de riesgo o características que podría presentar el huésped. (44)




Otras bacterias que tuvieron importancia al comparar los recuentos bacterianos en nuestras muestras fueron *Rothia (R.)* y *Lactococcus (L.)*.

*R. dentocariosa*, un cocobacilo grampositivo, es una bacteria comensal que forma parte de la orofaringe y las vías respiratorias. En el pasado se sabía que era causa de enfermedad periodontal, pero en los últimos años se ha descubierto que *R. dentocariosa* es la causa de algunas otras entidades infecciosas (45), además que en algunos estudios se ha concluido que esta especie está más asociada a enfermedades como pericoronitis (46) o lesiones de origen endodóntico. (47) Lo cual podría ayudarnos a entender por qué el recuento de esta bacteria mostró una menor abundancia en los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, pensando en que, como se cita en la hipótesis del trabajo de investigación “Los recuentos de bacterias periodontopatógenas serán más elevados en pacientes con adenocarcinoma pulmonar en comparación a pacientes libres de cáncer”.

*Lactococcus* fue también un género bacteriano que mostró una diferencia entre nuestros participantes, siendo más abundante en los casos. En un reporte de casos, un paciente inmunocomprometido presentó una infección abdominal asociada a *L. lactis* que fue asociada a un diagnóstico de periodontitis severa (48). Esta especie también está relacionada con cáncer en investigaciones dónde ha resultado favorable en la estabilización de células cancerosas inducidas en el epitelio. (49)

En el siguiente cuadro se pueden apreciar a las bacterias involucradas en los procesos periodontales más comunes y su relación con lo antes mencionado.

Periodonto sano	Periodontitis	Gingivitis
<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss. polymorphum</i>
<i>Rothia aeria.</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Corynebacterium matruchotii.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss. animalis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Neisseria sp.</i>	<i>Prevotella tantear</i>	<i>Prevotella oris</i>
<i>Fusobacterium nucleatum ss. vincentii</i>	<i>Leptotrichia sp.</i>	<i>Alloprevotella tannerae</i>
<i>Lautropia mirabilis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Neisseria oralis</i>
<i>Veillonella parvula</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss. animalis</i>
<i>Prevotella sp.</i>	<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>Corynebacterium durum</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Leptotrichia wadei</i>
<i>Neisseria elongata</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Aggregatibacter paraphrophilus</i>
<i>Fusobacterium sp.</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Leptotrichia sp.</i>	<i>Treponema sp.</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Actinomyces sp. HOT 171</i>	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Leptotrichia sp. HOT 212</i>
<i>Kingella oralis</i>	<i>Pyramidobacter piscolens</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
<i>Bergeyella sp. HOT 322</i>	<i>Prevotella oris</i>	<i>Prevotella oulorum</i>
<i>Fusobacterium nucleatum ss. Animalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss. polymorphum</i>	<i>Aggregatibacter sp. HOT 458</i>
	<i>Treponema denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i>
	<i>Treponema sp. HOT 237</i>	<i>Fusobacterium nucleatum ss. vincentii</i>
		<i>Actinomyces sp. HOT 170</i>
		<i>Saccharibacteria (TM) [G-1] sp. HOT 347</i>

 Actinobacteria  
 Firmicutes  
 Bacteroidetes

La información existente sobre las bacterias periodontopatógenas y su relación con enfermedades como el cáncer de pulmón indica que existen variables de importancia para estudios como éste. Dentro de ellas se encuentran los factores de riesgo, la importancia del nivel taxonómico obtenido a través de los análisis genéticos para las comparaciones de los perfiles bacterianos y las características que influyen en la aparición, progresión y evolución de ambas enfermedades

Otro aspecto a discusión, es la existencia de las características clínicas bucales que podrían revelar información importante para obtener conclusiones más objetivas. Existen metodologías estandarizadas y aprobadas para medirlas, como el índice periodontal comunitario (50), que incluso se ha empleado en pacientes que requieren metodologías más adecuadas a las condiciones en las que podrían encontrarse personas con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar.



## 10. CONCLUSIONES.

El estudio de las enfermedades bucodentales está en constante crecimiento y con ello los recursos que se ocupan para la obtención de información relevante sobre patologías orales con importancia epidemiológica, como la enfermedad periodontal. Estudios como éste, elaborado con herramientas como la secuenciación genética, nos ayudan a identificar microorganismos cada vez más específicos, los cuales aportan datos valiosos para las líneas de investigación involucradas.

A pesar de que la abundancia bacteriana presente en esta cohorte de pacientes indica diferencias entre casos y controles, no son estadísticamente significativas. El género *Streptococcus* fue el más abundante en las 46 muestras. Y aunque se ha descrito la relación de esta bacteria con la E.P. podría estar involucrada con otras

enfermedades como la caries. Para explicar esto sería importante tomar en cuenta nuevas variables, así como la evaluación clínica bucal de los pacientes.

El estudio de la relación del microbioma y las enfermedades puede contribuir a la obtención de nuevos descubrimientos diagnósticos y de tratamiento.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1 Estadificación Cáncer de Pulmón

Tumor primario

<b>Tx</b>		No puede evaluarse el tumor primario
<b>T0</b>		No existe evidencia de tumor primario
<b>T1</b>		Tumor $\leq 3$ cm de diámetro rodeado de pulmón o pleura visceral, sin evidencia de bronquio principal
	T1a(mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
	T1a	Tumor $\leq 1$ cm

	T1b	Tumor >1cm pero <2cm
	T1c	Tumor >2 cm pero <3 cm
<b>T2</b>		Tumor >3 cm pero < 5 cm; o tumor que involucra el bronquio principal (sin afectar la carina), invade la pleura visceral, asociada con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar
	T2a	Tumor >3 cm pero <4 cm
	T2b	Tumor >4 cm pero <5 cm
<b>T3</b>		Tumor >5 cm pero < 7 cm o que involucre pared torácica, nervio frénico, pericardio parietal o nódulos tumorales separados asociados en el mismo lóbulo que los tumores
<b>T4</b>		Tumor de >7 cm o que involucre diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulos tumorales.

Ganglios linfáticos.

Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales y / o hiliares ipsilaterales e intrapulmonares, incluida la participación por extensión directa
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos y / o subcarinales ipsilaterales
N3	Metástasis en el mediastino contralateral, hilar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral o ganglios linfáticos supraclaviculares

Metástasis.

<b>M0</b>		Sin metástasis a distancia
<b>M1</b>		Metástasis distante
	M1a	Nódulos tumorales separados en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico maligno
	M1b	Metástasis extratorácica única en un solo órgano
	M1c	Metástasis extratorácicas múltiples en uno o varios órganos

Sitios comunes de metástasis

<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Sitios comunes de metástasis</b>
Colón	Hígado, peritoneo, <b>pulmón</b>
Estómago	Hígado, peritoneo, <b>pulmón</b>
Melanoma	Cerebro, hígado, hueso, músculo, piel, <b>pulmón</b>
Ovario	Hígado, peritoneo, <b>pulmón</b>
Páncreas	Hígado, peritoneo, <b>pulmón</b>
Próstata	Glándula suprarrenal, hígado, hueso, <b>pulmón</b>

<b>Pulmón</b>	<b>Cerebro, glándula suprarrenal, hueso, hígado, otro pulmón</b>
Recto	Hígado, peritoneo, <b>pulmón</b>
Riñón	Cerebro, glándula suprarrenal, hueso, hígado, <b>pulmón</b>
Seno	Cerebro, hígado, hueso, <b>pulmón</b>
Tiroides	Hígado, hueso, <b>pulmón</b>
Útero	Hígado, hueso, peritoneo, <b>pulmón</b> , vagina
Vejiga	Hígado, hueso, <b>pulmón</b>

Sistema de estadificación

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Oculto	Tx	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a(mi)/T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0

IB	T2b	N0	M0
IIA	T1a/T2b	N0	M0
IIB	T1a/T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a/T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/N1	M0
IIIB	T1a/T2b	N3	M0
	T3/T4	N2	M0
IIIC	T3/T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a/M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

## Anexo 2. Consentimiento informado.

### VARIACIONES DE LA MICROBIOTA SALIVAL EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CDMX, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

La División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México en conjunto con el Servicio de Neumología del Hospital General de México y la Unidad de Oncología Torácica del Instituto Nacional de Cancerología llevarán a cabo la investigación titulada "Variaciones de la microbiota salival en pacientes con adenocarcinoma pulmonar".

- I. El estudio tiene como finalidad identificar los microorganismos (bacterias) presentes en saliva que nos ayuden a hacer el diagnóstico de cáncer de pulmón. La saliva es un medio muy atractivo ya que la toma de la muestra es sencilla, sin dolor y sin riesgos, esto ayudaría principalmente a adultos mayores, donde la toma de muestras de sangre en ocasiones puede ser complicado.
- II. Para el desarrollo del estudio se tendrán dos grupos de individuos, el primer grupo con diagnóstico confirmado de adenocarcinoma pulmonar y el segundo serán individuos libres de adenocarcinoma pulmonar. La muestra de saliva de tomará en un horario entre las nueve y las once de la mañana, cada uno de los participantes seleccionados deberán no haber ingerido alimento alguno ni haber hecho higiene bucal mínimo una hora antes de la toma de muestra, de ser necesario se hará un enjuague con agua; cumplidos los requisitos deberá depositar alrededor de 5mL. De saliva en un tubo de plástico en un tiempo no mayor a treinta minutos para su posterior procesamiento y análisis.
- III. La toma de muestras de saliva no implica riesgo o molestia alguna.
- IV. El desarrollo de este estudio tiene como principal beneficio el identificar en saliva las bacterias específicas o características en cáncer de pulmón para que en un futuro puedan ser empleadas como herramientas diagnósticas no invasivas.
- V. Una alternativa en cuanto al diagnóstico del cáncer de pulmón es la toma de biopsia la cual consiste en obtener una fracción del tejido afectado, radiografías y tomografías que en conjunto dan información acerca del tipo de cáncer, así como su tamaño y pronóstico.
- VI. En caso de que usted tenga alguna duda después de haber proporcionado las muestras acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios, y otros asuntos relacionados con la investigación podrá ponerse en contacto con el Dr. Alejandro Hernández Solís al teléfono 55 68 57 2559 ó la Dra. Gabriela Mercado Celis al teléfono 56 22 55 48.
- VII. Usted cuenta con la libertad de retirar su participación en el estudio en cualquier momento y dejar de participar en él, sin que por ello se creen perjuicios para continuar con su cuidado y tratamiento.
- VIII. Durante la toma de muestra se recabará información personal como nombre, edad, domicilio, teléfono, ocupación, enfermedades presentes en usted y su familia, medicamentos que esté tomando al momento. Toda esta información será confidencial y solamente el personal relacionado con la investigación tendrá acceso al mismo. La hoja en la que se coleccionarán los datos será almacenada en el Laboratorio de Genómica Clínica ubicado en División de Estudios de Posgrado de Odontología de la UNAM en un archivero al que solamente tiene acceso el personal relacionado con el proyecto.
- IX. Este estudio de investigación no proporciona resultados individuales por lo que si usted desea conocer los resultados de esta se le podrán proporcionar y explicar a detalle los trabajos derivados de la misma (artículos científicos, tesis de titulación).
- X. La toma de muestra de saliva no pone en riesgo al paciente.
- XI. Todos los gastos para la toma de muestra, procesamiento, medición de ADN bacteriano serán sufragados por el Laboratorio de Genómica Clínica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Activar  
if a Conf

He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Nombre \_\_\_\_\_ del participante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

7. Car... 1

Huella digital en caso de que lo amerite



Firma del investigador \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

#### TESTIGOS

Nombre del Testigo 1 \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Nombre del Testigo 2 \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

### Anexo 3. Tabla de variables.

Variable	Tipo de variable	Definición	Escala de medición
<b>Edad</b>	Discreta	Tiempo de vida a partir del nacimiento.	Número de años cumplidos.
<b>Sexo</b>	Nominal	Características biológicas y fisiológicas que definen hombre y mujer.	Masculino Femenino
<b>Lugar</b>	Nominal	Lugar de recolección de muestra.	INCAN HGM INMEGEN Clínica del tabaco F.O. Otro.
<b>Peso</b>	Continua	Medida en kg del total de la masa corporal.	Kg de peso actualmente.
<b>Origen</b>	Nominal	Lugar en dónde actualmente reside.	Estados de México u otro país.
<b>Alimentos</b>	Cualitativa	Se ingirió alimentos a la toma de muestra.	Si No
<b>Bebidas</b>	Cualitativa	Se ingirieron bebidas a la toma de muestra.	Si No
<b>HigOral</b>	Cualitativa	Se realizó higiene bucal a la toma de muestra.	Si No
<b>AntFamCan</b>	Cualitativa	Presencia de cáncer en familiares	Si No No contestó
<b>AntFamCPul</b>	Cualitativa	Presencia de cáncer de pulmón en familiares.	Si No No contestó
<b>Alcoholismo</b>	Cualitativa	Antecedentes personales de alcoholismo.	Si No No contestó
<b>Drogadiccion</b>	Cualitativa	Antecedentes personales de drogas.	Si No No contestó
<b>Alergicos</b>	Cualitativa	Antecedentes personales de alergias.	Si No No contestó
<b>Neurológicos</b>	Cualitativa	Antecedentes personales neurológicos.	Si No No contestó
<b>Cardiovasculares</b>	Cualitativa	Antecedentes personales cardiovasculares.	Si No No contestó
<b>Respiratorio</b>	Cualitativa	Antecedentes personales respiratorios.	Si No No contestó
<b>Gastrointestinal</b>	Cualitativa	Antecedentes personales respiratorios.	Si No No contestó



<b>Musculoesquelético</b>	Cualitativa	Antecedentes personales musculo esqueléticos.	Si No No contestó
<b>Endocrino</b>	Cualitativa	Antecedentes personales endócrinos.	Si No No contestó
<b>Dermatológicos</b>	Cualitativa	Antecedentes personales dermatológicos	Si No No contestó
<b>Genitourinario</b>	Cualitativa	Antecedentes personales genitourinarios.	Si No No contestó
<b>Hemolinfático</b>	Cualitativa	Antecedentes personales hemolinfáticos.	Si No No contestó
<b>Oncológicos</b>	Cualitativa	Antecedentes personales oncológicos.	Si No No contestó
<b>Psicológicos</b>	Cualitativa	Antecedentes personales psicológicos.	Si No No contestó
<b>Enfermedad</b>	Cualitativa	Enfermedades que padece actualmente.	Nombre de la enfermedad.
<b>Medicamentos</b>	Cualitativa	Toma o no algún medicamento.	Si No No contestó
<b>Tipo</b>	Nominal	Medicamentos que toma actualmente.	Nombre de medicamento (s).
<b>Estado</b>	Cualitativa	Estado tabáquico actual.	Fumador Ex fumador Nunca fumador
<b>Inicio</b>	Continua	Edad a la que inició el tabaquismo	Años cumplidos al momento de comenzar a fumar.
<b>Años</b>	Continua	Años que fumó o lleva fumando	Número de años en tabaquismo.
<b>RiesgPaq</b>	Intervalo	Índice de paquete año (IPA)	<30 P.A. ≥30 P.A.
<b>Pasivo</b>	Cualitativa	Es o no fumador pasivo.	Si No
<b>Trabajo</b>	Nominal	Ocupación actual.	Nombre de la profesión u oficio.
<b>Años Trab</b>	Discreta	Años que tiene en su ocupación actual.	Número de años trabajando.
<b>Polvo</b>	Cualitativa	Exposición al polvo.	Si No No contestó
<b>Gas</b>	Cualitativa	Exposición a gas.	Si No No contestó
<b>Radón</b>	Cualitativa	Exposición a radón.	Si No No contestó

<b>Coca</b>	Cualitativa	Exposición a coca.	Si No No contestó
<b>Cadmio</b>	Cualitativa	Exposición a cadmio.	Si No No contestó
<b>Aluminio</b>	Cualitativa	Exposición Aluminio.	Si No No contestó
<b>Berilio</b>	Cualitativa	Exposición a berilio.	Si No No contestó
<b>A. Sulfúrico</b>	Cualitativa	Exposición A. Sulfúrico.	Si No No contestó
<b>Bis</b>	Cualitativa	Exposición BIS	Si No No contestó
<b>Sílice</b>	Cualitativa	Exposición a sílice.	Si No No contestó
<b>Arsénico</b>	Cualitativa	Exposición a arsénico.	Si No No contestó
<b>Carbón</b>	Cualitativa	Exposición a carbón.	Si No No contestó
<b>Hierro</b>	Cualitativa	Exposición a hierro.	Si No No contestó
<b>GMostaza</b>	Cualitativa	Exposición a GMostaza.	Si No No contestó
<b>Rx</b>	Cualitativa	Se cuenta o no con una radiografía de tórax.	Sí No
<b>RxEstado</b>	Nominal	La radiografía se muestra normal o no.	Normal Anormal
<b>Estadio</b>	Ordinal	Estadio en el que se encuentra	3 4 No estadificado.
<b>EGFR</b>	Cualitativa	Se encontró mutación en EGFR.	Si No se reportó
<b>KRAS</b>	Cualitativa	Se encontró mutación en KRAS.	Si No se reportó
<b>ALK</b>	Cualitativa	Se encontró mutación en ALK.	Si No se reportó

## **Anexo 4. Protocolos utilizados para la metodología.**

### Toma de muestra.

La toma de muestra se llevó a cabo por personal involucrado en el proyecto, además de previamente entrenado, con el equipo de protección apropiado y con base en las buenas prácticas en investigación del microbioma humano de Knight y col. (51), en un horario de entre las 9:00 y 11:00 hrs. Previo a la toma de muestra (una hora antes) el paciente debe evitar el consumir alimentos y/o bebidas, fumar, cepillar los dientes y besar, finalmente hacer la toma de muestra de aproximadamente 5 ml.

Los pacientes realizaron un enjuague con agua desionizada por 60 segundos, inclinando su cabeza permitiendo así la acumulación de saliva en piso de boca para después colectar en un tubo Falcon de 50 ml. el cual se rotuló con identificadores tal como establece Petra ten Hooften (52). Este tubo siempre se mantiene en un vaso con hielos aproximadamente a 4 °C. no se debe exceder de los 30 minutos para la colección de la saliva. También se menciona al paciente no toser, ni expectorar esputo.

La muestra se colocó en un contenedor con refrigerantes para conservar la temperatura de 4 °C. y en un tiempo menor a una hora se transportó al Laboratorio de Genómica Clínica para su procesamiento siempre con el equipo de protección personal y desinfección de área de trabajo.

### Procesamiento de saliva.

- Calibrar y programar a 4°C la centrífuga.
- Una vez alcanzada la temperatura, centrifugar la muestra a 2600 g. durante un tiempo de 15 minutos para permitir la separación del sobrenadante y el pellet.
- Separar el pellet en crioviales y añadir 100 µL de PBS (buffer fosfato salino).

- Asignar un número serial a cada uno de los viales para su identificación, el cual también se coloca en la hoja de recolección de datos.
- Todas las muestras se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. (53)

#### Extracción del ADN bacteriano.

Para la extracción del ADN bacteriano se utiliza el kit DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del proveedor:

- Descongelar las muestras a temperatura ambiente
- Tomar 200  $\mu\text{L}$ . de pellet y colocar en un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL.
- Centrifugar  $100 \times 100\text{g}$  por 10 minutos a temperatura ambiente,
- Retirar el sobrenadante y se colocar en los desechos.
- Añadir 300  $\mu\text{L}$  de solución powerbeat y 50  $\mu\text{L}$  de solución SL al nuevo pellet.
- Incubar en thermoblock por 10 min a  $55^{\circ}\text{C}$ .
- Coloca la muestra en el tubo con perlas y llevar a vórtex por 10 minutos
- Centrifugar  $100 \times 100\text{g}$  por 2 minutos.
- Cambiar el sobrenadante a un nuevo tubo,
- Incorporar 100  $\mu\text{L}$  de solución IRS.
- Aplicar vórtex por 5 segundos.
- Incubar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.
- Centrifugar  $100 \times 100\text{g}$  por 2 minutos.
- Realizar el cambió del sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf de 2mL.
- Agregar 900  $\mu\text{L}$  de solución SB.
- Vórtex por 5 segundos.
- Transferir a un tubo con filtro.

- Centrifugar 100X100g por 2 minutos.
- Colocar 300  $\mu$ L de solución CB.
- Centrifugar 100X100g por 2 minutos
- Eluir con 40  $\mu$ L de agua destilada libre de DNAsas/RNAsas (UltraPure™ de Invitrogen) precalentada a 55°C dejando reposar 5 minutos.
- Centrifugar 100X100g por 2 minutos.
- Recuperar todo el volumen (aproximadamente 40  $\mu$ L) colocando 6  $\mu$ L en un tubo de PCR de 0.2 mL. y el restante en un criovial ya rotulado con su identificador para ser almacenado en -80 °C.

#### Cuantificación de ADN bacteriano

Una vez obtenido el ADN bacteriano de cada muestra, se realiza la primera cuantificación con el equipo NANODROP 2000 (Thermo Scientific), tomando un volumen de 2 $\mu$ L por muestra para su cuantificación (los cuales se toma de los 6 $\mu$ L depositados en el tubo de 0.2mL mencionados en la extracción del ADN bacteriano) y utilizando como blanco agua destilada libre de DNAsas/RNAsas (UltraPure™ de Invitrogen).

Para evaluar la integridad del material genético bacteriano se lleva a cabo la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Invitrogen).

- Tomar 100mL de buffer Tris- acetato y EDTA (TAE) 1X (ThermoFisher).
- En todos los geles designar el primer pozo para la colocación del peso molecular compuesto por 1 $\mu$ L de 1 kb DNA Ladder (Biolab), 1 $\mu$ L de buffer de carga (Biolab) y 4  $\mu$ L de agua destilada previamente filtrada.
- En los demás pozos colocar las muestras (4 $\mu$ L de cada muestra y 2mL de buffer de corrida).
- Correr todos los geles en la fuente de poder a 120V, durante 1 hora.

- Teñir con GelRed (PAGE GelRed®).

### Secuenciación.

Para la preparación de librerías, se utilizó el protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library preparation (Illumina). En primera instancia se realizó la amplificación de la región hipervariable V3-V4 de la unidad bacteriana ribosomal pequeña 16s con los oligonucleótidos descritos en el protocolo.

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTA

#### *Amplificación por PCR y secuenciación*

- Realizar la mezcla de reacción por muestra : ADN microbiano, Amplicon PCR Forward Primer, Amplicon PCR Reverse Primer y 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix
- Colocar 25 µL en cada pozo de la placa o tiras de tubos (dependiendo del número de muestras).
- Sellar la placa de tubos.
- Llevar al termociclador.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Eliminar la tapa adhesiva.
- Colocar las microplacas en la placa de separación magnética hasta que se forma el pellet de perlas.

- Agregar 200  $\mu$ L de etanol al 80%, previamente preparado, a cada pozo de reacción.
- Incubar por 30 segundos, cambiando el sentido de la placa para hacer pasar las perlas hasta la pared opuesta del pozo.
- Esperar a que se forme el pellet.
- Eliminar el sobrenadante.
- Realizar un nuevo lavado siguiendo las anteriores indicaciones.
- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente por no más de 10 minutos.
- Retirar la placa de la placa de separación magnética.
- Agregar 52.5  $\mu$ L de Tris 10 mM pH 8.5 a cada pozo.
- Homogenizar por pipeteo durante 10 veces.
- Sellar la placa y dar vortex a 1800 rpm durante 2 minutos
- Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos
- Colocar nuevamente la placa en la placa de separación magnética.
- Esperar 2 minutos o que se forme el pellet con las perlas
- Etiquetar una nueva placa y transferir 50  $\mu$ L de sobrenadante del paso anterior.

\*Es importante el cambio de la punta entre cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

### *Ligación de índices*

Para la mezcla de los índices, organizar en el TrueSeq Index Plate:

-Los tubos de primer 2 (tapas blancas) de manera vertical, alineados de las filas A/H

-Los tubos de primer 1 (tapas naranjas) de manera horizontal, alineados de las columnas 1/12.

- Una vez seleccionados los índices, preparar la mezcla de adaptadores.
- Homogenizar por pipeteo 10 veces.
- Sellar la placa
- Centrifugar a 1000 x g. a 20°C durante un minuto.

La ligación se llevó a cabo en el termociclador.

### *Segunda limpieza*

- Centrifugar la placa de PCR a 280 x g a 20°C por un minuto para precipitar el líquido.
- Transferir 50 µL de cada pozo de reacción a la placa MIDI.
- Dar vortex a las perlas AMPure XP por 30 segundos para dispersarlas.
- Agregar 56 µL de perlas AMPure XP a cada pozo de reacción.
- Mezclar por pipeteo 10 veces (cambiar de punta entre cada muestra)
- Sellar las placas.
- Dar vortex en el bioshake a 1800 rpm durante 2 minutos usando la placa MIDI.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Colocar las microplacas en la placa de separación magnética hasta que se forme el pellet de perlas y el sobrenadante sea translúcido.
- Eliminar el sobrenadante de cada pozo de reacción sin perturbar las perlas.
- Agregar a cada pozo de reacción 200 µL de etanol al 80%, previamente preparado.



- Incubar por 30 segundos.
- Cambiar el sentido de la placa para hacer pasar las perlas hasta la pared opuesta del pozo.
- Esperar la formación de pellet
- Eliminar el sobrenadante.
- Realizar un nuevo lavado siguiendo las anteriores indicaciones.
- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Retirar la placa de la placa de separación magnética.
- Agregar 27.5  $\mu$ L de Tris 10 mM pH 8.5 a cada pozo.
- Homogeneizar por pipeteo 10 veces
- Sellar la placa.
- Vortexear a 1800 rpm durante 2 minutos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos
- Colocar nuevamente la placa en el placa de separación magnética.
- Esperar 2 minutos o hasta formar el pellet con perlas.
- Etiquetar una nueva placa.
- Transferir 25  $\mu$ L del sobrenadante del paso anterior.

Como punto de control de calidad, 1  $\mu$ L de una dilución 1:50 de la librería final se bioanalizó en el chip DNA 1000 para verificar el tamaño de fragmentos (usando los cebadores V3 y V4, se obtuvieron amplicones de 630 pb aproximadamente).

#### *Cuantificación, normalización y agrupación (pooling)*

Se calcula la concentración de ADN en nM, basado en el tamaño de amplicones de ADN determinados por los trazos del bioanalizador 2100 (Agilent Technologies).

Una vez obtenida la concentración final de cada librería se realiza la dilución correspondiente con buffer de resuspensión (RBS) o 10 mM Tris pH 8.5 para obtener una concentración final de 4 nM, tomamos 5 µL de la alícuota diluida de cada biblioteca para mezclarlas.

### *Desnaturalización y cargado*

- Combinar el agrupado final de librerías con NaOH 0.2 N.
- Dar vortex a la mezcla por 30 segundos
- Centrifugar a 280gxm a 20°C por un minuto.
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar en cadena sencillas.
- Agregar 990 µL de HT1 pre-enfriado al tubo con los 10 µL de librerías previamente desnaturalizadas.

### *Dilución del DNA desnaturalizado*

- Diluir el ADN desnaturalizado a la concentración deseada usando el siguiente ejemplo:

Final Concentration	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
Pre-chilled HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl

### ILUSTRACIÓN 2. CÁLCULO DE DILUCIÓN

- Invertir varias veces para mezclar.
- Centrifugar por pulsos la solución de ADN.
- Colocar el ADN desnaturalizado y diluido en hielo.

### *Desnaturalización y dilución del control PhiX*

- Combinar los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca PhiX a 4 nM:
  - 10 nM PhiX library (2  $\mu$ l)
  - 10M Tris pH 8.5 (3  $\mu$ l).
  
- Posteriormente combinar los siguientes volúmenes de PhiX 4 nM y NaOH 0,2 N en un tubo de microcentrífuga:
  - 4 nM PhiX library (5  $\mu$ l)
  - 0.2 N NaOH (5  $\mu$ l)
  
- Una vez combinados dar vórtex breve para mezclar la solución de la biblioteca PhiX 2 nM. Para después incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la biblioteca PhiX.
  
- Se agregan los siguientes volúmenes de HT1 pre-enfriado al tubo que contiene PhiX desnaturalizado para tener como resultado una biblioteca PhiX de 20 pM:
  - Biblioteca PhiX desnaturalizada (10  $\mu$ l).
  - HT1 pre-enfriado (990  $\mu$ l).
  
- Se diluye la biblioteca PhiX desnaturalizada de 20 pM a la misma concentración de carga que la Biblioteca de amplicones de la siguiente manera (Ilustración 2):

Final Concentration	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
Pre-chilled HTI	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl

ILUSTRACIÓN 3. CARGA DE BIBLIOTECA

- Finalmente se centrifuga por pulsos la solución de ADN y colocó el PhiX desnaturalizado y diluido en hielo.

Para la secuenciación se combinaron los siguientes volúmenes de biblioteca de control PhiX desnaturalizada y su biblioteca de amplicones en un tubo de microcentrífuga:

#### Análisis de datos de Secuenciación.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el software RStudio con la paquetería DADA2. El primer paso fue ingresar las secuencias en formato fastaq paired-end de las 46 muestras seleccionada para posteriormente llevar a cabo la clasificaron en secuencias Forward y Reverse para realizar la inspección de calidad de las mismas con las librerías ggplot2 y cowplot, una vez obtenidos los gráficos de calidad de las muestras y teniendo claro los puntos de corte, se realizó el corte 280 Forward 220 Reverse, se verificaron los cortes por medio tasas de error y así evitar algún tipo de sesgo en pasos posteriores, lo siguiente fue el realizar el emparejamiento de las secuencias (Forward y Reverse) y así obtener un resumen de cada una de las muestras, se detectaron secuencias quiméricas para su eliminación posterior y obtener el porcentaje de lecturas verdaderas. Una vez terminado el pre-procesamiento de las 46 se llevó a cabo la asignación taxonómica por medio de la base de datos 16S SILVA V.138.1. Una vez hecha la asignación se ingresó la metadata con las variables a trabajar y así se obtuvo la significancia a nivel de Filo y Género.

Siguiendo el manual se utilizará la base de datos de referencia a trabajar (SILVA) (54) en la cual se encuentran las secuencias representativas de los OTUs y su taxonomía.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Vargas Casillas AP. Periodontología e implantología In: Yañez Ocampo BR, Monteagudo Arrieta CA, autor, editors. Segunda ed. México, D.F. : Editorial Médica Panamericana, [2021] 2021. p. 450 páginas.
2. Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2020;83(1):14-25.
3. Mai XD, Genco RJ, LaMonte MJ, Hovey KM, Freudenheim JL, Andrews CA, et al. Periodontal Pathogens and Risk of Incident Cancer in Postmenopausal Females: The Buffalo OsteoPerio Study. *Journal of Periodontology*. 2016;87(3):257-67.
4. N. T-C. Consumo de tabaco y enfermedad periodontal. *Investigaciones Medicoquirúrgicas*; 2020.
5. Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Periodontal Research*. 1977;12(4):227-34.
6. Nield H. LINDHE'S CLINICAL PERIODONTOLOGY AND IMPLANT DENTISTRY (7TH EDITION) [TWO VOLUMES]. *BRITISH DENTAL JOURNAL*. 2021;231(10):613-.
7. Ortega SM, Kremer Sendrós S, De la Cruz M, Sin C, Britos M, Fernández D. Diabetes y enfermedad periodontal. *Rev Ateneo Argent Odontol*. 2021:64-70.
8. Pineda Bombino L, Toledo Pimentel BF, Veitia Cabarrocas F. Enfermedad periodontal inflamatoria crónica y enfermedades cardiovasculares. *Medicentro Electrónica*. 2020;24(2):337-59.
9. Bolaños A-F, Jaramillo J-J, Jiménez A, Moreno F, Moreno-Correa S. Relación entre la enfermedad periodontal y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica: revisión de la literatura. *Universitas Medica*. 2020;61(3):12-31.
10. Ruíz-Godoy LM, Rizo P, Sánchez F, Osornio A, García C, García AM. Lung cancer mortality in Mexico. *BioMed Central*; 2007.
11. Salud OMdl. Cancer. 12 September 2018.

12. Thiri3n Romero I, P3rez Padilla R, Garc3a Sancho C, Torre Bouscoulet L. Tabaquismo y c3ncer de pulm3n. Cincuenta a3os de evidencia.
13. C3ncer INd. C3ncer de pulm3n. 25 de octubre de 2019.
14. Lletj3s P, Contiente X, Arechavala T, Fern3ndez E, Schiaffino A, P3rez-R3os M, et al. Asociaci3n entre el humo ambiental de tabaco y el estado de salud en la poblaci3n infantil. Association between exposure to second-hand smoke and health status in children (English). 2018.
15. J3nemann A, Legarreta CG. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Produced by Biomass Fuels. *Clinical Pulmonary Medicine*. 2008;15(6):305.
16. Arrieta O, Zatarain-Barr3n ZL, Aldaco F, Barr3n F, B3ez-Salda3a R, Campos-G3mez S, et al. Lung Cancer in Mexico. *Journal of Thoracic Oncology*. 2019;14(10):1695-700.
17. Garc3a Rodr3guez ME, Armas P3rez BA, Koelig Padr3n R, Armas Moredo K. La octava edici3n del TNM en c3ncer pulmonar: evaluaci3n del descriptor T / The 8th edition of TNM in lung cancer: T descriptor evaluation. *Revista Archivo M3dico de Camag3ey*. 2016:118-22.
18. Hwang JK, Page BJ, Flynn D, Passmore L, McCaul E, Brady J, et al. Validation of the Eighth Edition TNM lung cancer staging system. *Journal of Thoracic Oncology*. 2020;15(4):649-54.
19. Kilian M. The oral microbiome—friend or foe? *European journal of oral sciences*. 2018;126:5-12.
20. L3pez-Go3i I. Microbioma humano: un universo en nuestro interior. Sociedad Espa3ola de Bioqu3mica y Biolog3a Molecular. 2020.
21. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome research*. 2012;22(2):299-306.
22. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;99:883-93.
23. Karpi3ski TM. Role of oral microbiota in cancer development. *Microorganisms*. 2019;7(1):20.
24. Kochurova E, Kozlov S. The diagnostic possibilities of saliva. *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*. 2014(1):13-5.
25. Yan X, Yang M, Liu J, Gao R, Hu J, Li J, et al. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *American journal of cancer research*. 2015;5(10):3111.
26. Lim MY, Yoon HS, Rho M, Sung J, Song Y-M, Lee K, et al. Analysis of the association between host genetics, smoking, and sputum microbiota in healthy humans. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-9.
27. Sonnenwirth AC, Jarett L. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, vol. 2. St Louis. 1980:507-9.
28. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Critical Reviews in oral biology & medicine*. 2002;13(2):197-212.
29. Chojnowska S, Baran T, Wili3ska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Kna3 M. Human saliva as a diagnostic material. *Advances in medical sciences*. 2018;63(1):185-91.

30. Rao NL, Shetty S, Upadhyaya K, R M P, Lobo EC, Kedilaya H, et al. Salivary C-reactive protein in Hashimoto's thyroiditis and subacute thyroiditis. *International Journal of Inflammation*. 2010;2010.
31. Wong D. Saliva the body's mirror. *Dimensions of Dental Hygiene*. 2006;4:14-7.
32. Cone EJ, Clarke J, Tsanaclis L. Prevalence and disposition of drugs of abuse and opioid treatment drugs in oral fluid. *Journal of analytical toxicology*. 2007;31(8):424-33.
33. Vesty A, Gear K, Biswas K, Radcliff FJ, Taylor MW, Douglas RG. Microbial and inflammatory-based salivary biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical and experimental dental research*. 2018;4(6):255-62.
34. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E, Vargas-Albores F. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*. 2015;41(4):297-313.
35. Betancor L, Gadea M, Flores K. *Genética bacteriana*. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR) Temas de Bacteriología y Virología Médica 3ra Ed Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR. 2008:65-90.
36. Schulz S, Porsch M, Grosse I, Hoffmann K, Schaller H-G, Reichert S. Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects. *Archives of Oral Biology*. 2019;99:169-76.
37. Abusleme L, Diaz PI, Silva N, Dupuy AK, Strausbaugh LD, Dutzan N, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*. 2013;7(5):1016-25-25.
38. Panagiotis Andreas C, Nikolaos Andreas C. Periodontal Disease Indices and Lung Cancer Risk in Greek Adults: a Case - Control study. *ScopeMed*; 2016. p. 64.
39. Michaud DS KK, Papathanasiou E, Genco CA, Giovannucci E. Periodontal disease and risk of all cancers among male never smokers: an updated analysis of the Health Professionals Follow-up Study.: *Ann Oncol*; 2016.
40. Balaji A, Surekha V, Valiathan M, Mahalakshmi K. Gram-positive microorganisms in periodontitis. *Drug Invention Today*. 2019;12(6):1199-203-203.
41. Xiaochi S, Yue H, Yong Y, Qinye L, Xi Z. The Composition Alteration of Respiratory Microbiota in Lung Cancer. *Informa UK Limited*; 2020. p. 158-68.
42. Reports from J. Lopez-Martinez et al Highlight Recent Findings in Periodontitis (Bacteria associated with periodontal disease are also increased in health). 2020 08/07/.
43. Ni'Mah M, Kriswandini IL, Baktir A, editors. *Antigenic Protein Profile of Streptococcus mutans Biofilm for Developing of Dental Caries and Periodontal Disease Risk Biomarker* 2019: Institute of Physics Publishing.
44. MacDonald KW, Chanyi RM, Macklaim JM, Cadieux PA, Reid G, Burton JP. *Streptococcus salivarius* inhibits immune activation by periodontal disease pathogens. *Springer Science and Business Media LLC*; 2021.
45. Willner S, Imam Z, Hader I. *Rothia dentocariosa* Endocarditis in an Unsuspecting Host: A Case Report and Literature Review. *Case Reports in Cardiology*. 2019:1-3.
46. Pardi G. Aspectos microbiológicos de la pericoronitis. In: Perroni M, editor. 2005.

47. Pardi G, Acevedo AM, Dellja RM, Perrone M. Studies over Rothia Dentocariosa present in patients with and without dental caries. JOURNAL OF DENTAL RESEARCH. 1996;75(5):1321-.
48. Fragkiadakis K, Ioannou P, Barbounakis E, Samonis G. Intra-abdominal abscesses by Lactococcus lactis ssp cremoris in an immunocompetent adult with severe periodontitis and pernicious anemia. IDCases. 2017;7:27-9-9.
49. Jaskulski IB, Uecker J, Bordini F, Moura F, Gonçalves T, Chaves NG, et al. In vivo action of Lactococcus lactis subsp. lactis isolate (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium. Process Biochemistry. 2020;91:165-71.
50. da Silva RHA, Bastos JRdM, Mendes HJ, de Castro RFM, Camargo LMA. Cárie dentária, índice periodontal comunitário e higiene oral em população ribeirinha. (Portuguese). Dental caries, community periodontal index and oral hygiene in a riverside community (English). 2010;58(4):457-62.
51. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. Nature Reviews Microbiology. 2018;16(7):410-22.
52. Ten Hoopen P, Finn RD, Bongo LA, Corre E, Fosso B, Meyer F, et al. The metagenomic data life-cycle: standards and best practices. GigaScience. 2017;6(8):gix047.
53. Poussin C, Sierro N, Boué S, Battey J, Scotti E, Belcastro V, et al. Interrogating the microbiome: experimental and computational considerations in support of study reproducibility. Drug discovery today. 2018;23(9):1644-57.
54. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic acids research. 2012;41(D1):D590-D6.