



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

ANÁLISIS METATAXONÓMICO DE SALIVA COMO  
INDICADOR DE SALUD BUCAL EN POBLACIÓN  
PEDIÁTRICA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

MILCA DE LA O GARCÍA

TUTORA: DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 tutora la Dra. Gabriela E. Mercado Celis por su apoyo, confianza, paciencia a lo largo de este proyecto y por permitirme formar parte del laboratorio de genómica clínica. Toda mi admiración hacia usted.

A la Dra. Alejandra B. Cervantes Garduño por sus consejos, ayuda y tiempo brindado para mejorar cada aspecto del proyecto.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio de genómica clínica por sus comentarios hacia el proyecto que fueron de gran ayuda.

A la UNAM que me ha abierto las puertas a muchas oportunidades y experiencias.

## **DEDICATORIAS**

A mis papás Guillermo y Carmen por su apoyo incondicional en todas mis decisiones y por enseñarme a siempre dar lo mejor. ¡Gracias por creer en mí, los amo!

A mi hermana Brenda por estar en los buenos, malos y los peores momentos a mi lado, siempre juntas.

A mi sobrina Valentina por llegar a recordarme el significado de los pequeños detalles de la vida, gracias por llenar de alegría y ternura mi vida.

A Andy, Gris, Bren y Are por acompañarme a lo largo de esta etapa y hacerla más agradable. Porque a pesar de los días difíciles en la facultad siempre había tiempo para reírnos, gracias por todo.

A Gio, Mayra, Mare y Camilo por hacer del servicio social una experiencia única, gracias por todas las aventuras y el apoyo, ha sido muy bonito coincidir con ustedes.

*“Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre”  
M. Gandhi*

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	5
2. ANTECEDENTES .....	6
Enfermedades orales más frecuentes .....	6
Caries .....	6
Epidemiología .....	7
Índice de medición de caries .....	8
CPO y ceo .....	9
Nomenclatura de CPO/ceo .....	9
Saliva.....	11
Glándulas salivales .....	12
Composición y clasificación de la saliva .....	14
Como herramienta diagnostica .....	14
Biomarcadores salivales para el diagnóstico de caries.....	15
Perfil microbiano como marcador .....	15
Microbiota o microbioma .....	16
Definición .....	16
Microbioma en cavidad oral .....	17
Factores que modifican el microbioma.....	19
Metagenómica o metataxonomía.....	19
Definición .....	19
Ventajas como herramienta para el estudio del microbiota .....	20
Estudios de metataxonomía y caries .....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	23
5. OBJETIVOS .....	24
GENERAL.....	24
ESPECIFICOS.....	24
6. HIPÓTESIS .....	24
7. METODOLOGIA.....	25
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	25
DEFINICION DE VARIABLES.....	25

PARTICIPANTES .....	25
CASOS .....	25
CONTROLES .....	25
CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	26
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	26
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	26
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	26
Toma de muestra, procesamiento y almacenamiento .....	27
Exploración Bucal .....	27
Procesamiento de Muestras de Saliva .....	27
Extracción del DNA bacteriano y controles de calidad .....	27
Preparación de librerías .....	28
Amplificación por PCR .....	28
Limpieza de librerías .....	29
Ligación de índices .....	30
Ligación de índices .....	30
Segunda limpieza .....	31
Cuantificación, normalización y agrupación .....	32
Desnaturalización y cargado .....	32
Dilución del DNA desnaturalizado .....	33
Desnaturalización y dilución del control PhiX .....	33
Combinación de amplicones de librerías y control PhiX .....	34
8. RESULTADOS .....	36
PARTICIPANTES .....	36
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA .....	36
ANÁLISIS PRIMARIO .....	44
ANÁLISIS SECUNDARIO .....	45
9. DISCUSIÓN .....	50
10. CONCLUSIONES .....	54
11. ANEXOS .....	55
12. REFERENCIAS .....	59

# 1. RESUMEN

La caries es una enfermedad infecciosa, trasmisible y multifactorial caracterizada por bacterias que se adhieren y colonizan la superficie dental. Es la enfermedad dental más prevalente en población pediátrica a nivel mundial, en México aún es considerada un problema de salud pública para esta población. El índice CPO/ceo es el más utilizado para medir experiencia de caries en estudios epidemiológicos, sin embargo, tiene algunas limitaciones como es el detectar caries en las primeras etapas. A cerca del análisis metataxonómico este nos brinda perfiles bacterianos a través de la secuenciación del gen ARNr 16S, que ayuda a detectar la totalidad de bacterias incluso las que no pueden ser cultivadas de manera convencional.

El objetivo de este estudio fue relacionar los puntajes del índice CPO/ceo con los resultados del análisis metataxonómico de saliva en pacientes pediátricos.

Se tomaron 34 muestras de saliva de niños con y sin experiencia de caries evaluados con el índice CPO/ceo, se procesaron para la secuenciación del gen ARNr 16S. Los resultados mostraron el top 10 de especies encontradas en la que solo *S. tigurinus* fue estadísticamente significativa ( $p=0.010$ ) presentándose más en casos que en controles, en estudios previos esta especie se ha relacionado con caries.

Concluimos que la relación del índice con el análisis metataxonómico es baja, sin embargo, los resultados son prometedores ya que a pesar de que la mayoría de las especies no tuvieron un valor estadísticamente significativo, varios de los géneros obtenidos en nuestros resultados se han relacionado con caries en estudios previos.

## 2. ANTECEDENTES

### Enfermedades orales más frecuentes

Existen tres problemas dentales principales que afectan a la población mundial, caries, gingivitis y las maloclusiones. Estas alteraciones dentales también están presentes en la población pediátrica, siendo la de mayor prevalencia, la caries, afectando a un 95% de niños menores de 8 años (1). La segunda causa de morbilidad bucal es la gingivitis, la cual es una enfermedad bucodental que se caracteriza fundamentalmente por la inflamación de la mucosa gingival. Dentro de los signos más frecuentes que son observados se encuentran el cambio de color, tamaño y forma, así como, alteración en su consistencia y textura, posición y presencia de hemorragia. Se estima que las tasas de prevalencia son muy altas ya que más de las tres cuartas partes de la población la padecen o presentan un alto riesgo a desarrollarla. La prevalencia de la gingivitis aumenta con la edad, comienza en promedio a los 5 años y alcanza su punto máximo en la pubertad para después disminuir. Estudios epidemiológicos indican que la presencia de gingivitis en población pediátrica es inconstante. Murrieta y cols. reportaron en el año 2004 un 20.6% de prevalencia de gingivitis, principalmente en la región anterosuperior en escolares de la ciudad de México (2). Las maloclusiones son alteraciones del equilibrio entre los sistemas en desarrollo que componen al complejo orofacial y pueden afectar a los dientes, maxilar, mandíbula, articulación temporomandibular y músculos. Su frecuencia es variable en los diferentes países. En México en el año 2004 Montiel y cols. encontraron una prevalencia de maloclusión de 54% en niños de 6 a 12 años de la Ciudad de México (1, 3).

### Caries

La caries dental es una enfermedad multifactorial, infecciosa y trasmisible, causada por bacterias que se adhieren a la película adquirida del esmalte y colonizan la superficie dental (4). Para que una lesión cariosa se desarrolle tiene que interactuar con el esmalte, el microbiota y un sustrato bacteriano que permita la producción de ácidos durante un periodo determinado de tiempo, el cual depende de la estructura química del esmalte y, por lo tanto, de su resistencia a desmineralización por los ácidos bacterianos (1, 2). La velocidad de progresión de las lesiones es variable, y está relacionada con factores genéticos, anatómicos, dietéticos, costumbres familiares y sociales, entre otros (5).

La superficie dentaria esta bañada por la saliva y, entre ambas, ocurre un continuo intercambio de iones calcio y fosfato dando lugar a un ciclo constante de desmineralización – remineralización. Si la pérdida e incorporación de iones es similar, el resultado es el equilibrio y la superficie, aparentemente, permanece intacta. Sin embargo, el equilibrio puede alterarse. En presencia de carbohidratos fermentables, algunos microorganismos metabolizan ácidos orgánicos que dan lugar a una caída del pH favoreciéndose la desmineralización. Por el contrario, si están presentes iones de fluoruro, se forman cristales de fluorapatita, más resistentes a la agresión ácida (5). El proceso biológico que se produce es dinámico: desmineralización – remineralización, lo que implica que es posible controlar la progresión de la enfermedad y hacerla reversible en los primeros estadios (6).

## Epidemiología

La caries dental junto con la enfermedad periodontal, constituyen el mayor porcentaje de morbilidad dentaria durante toda la vida de un individuo. Afecta a personas de cualquier edad, sexo y raza; teniendo una mayor presencia en sujetos de bajo nivel socioeconómico. Esta situación guarda relación directa con un deficiente nivel educativo, una mayor frecuencia en el consumo de alimentos ricos en sacarosa entre las comidas, y el tiempo en que estos permanecen en la boca (7).

En las últimas décadas, países desarrollados han observado una disminución de la caries dental en ciertos sectores poblacionales, como los grupos pediátricos y de adolescentes. Aproximadamente el 50% de los niños de EE. UU., son considerados libres de caries desde 1993. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, como algunos de América Latina y el Caribe, este cambio ha sido lento, considerándose todavía un problema significativo de salud pública para la población infantil (8).

Desde los años 70 se ha documentado la caries dental como un problema de salud en México. Los datos de la encuesta efectuada por la Secretaría de Salud en 1980, sobre morbilidad bucal en escolares de la Ciudad de México, mostraron que los niños de 6 a 14 años presentaron un alto porcentaje de caries (95,5% en dientes permanentes). Estudios posteriores en los años 90, la ubicaban por arriba de 90%. En 1998, Mendoza y cols. reportaron una prevalencia de 17.9% y 62,5% para los grupos de edad de 6 y 12 años, respectivamente (8). Posteriormente, en 2009 Reynoso y cols., realizan un estudio donde participan 12 entidades federativas (Campeche, Chiapas, Chihuahua, CDMX, Guanajuato,



Guerrero, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz), con el fin de describir el estado de salud dentario y de posibles factores de riesgo asociados a caries de la infancia en preescolares. Del número de niños examinados se encontraron libres de caries el 60.6% a los tres años, disminuyendo con la edad hasta los seis años con el 38.9%. La prevalencia de caries en el grupo examinado fue del 91.0%; la severidad o el promedio del índice CPOD (dientes primarios cariados, perdidos u obturados) es de 2.4 dientes afectados. Los niños de 3 años presentaron un CPOD de 1.5 y los de 6 años presentaron casi 3 dientes afectados (9).

## Índice de medición de caries

Los problemas de salud o enfermedad de una población pueden medirse por medio de instrumentos que reciben el nombre de índices de salud o enfermedad. El índice es un valor numérico, por lo general, expresado por proporciones o coeficientes que describe una situación relativa de salud o enfermedad, en una determinada población, a través de una escala graduada, con límites superior e inferior definidos. Estos, a su vez, permiten comparar los resultados con los de otras poblaciones clasificadas según los mismos métodos y criterios. Los índices sirven como indicadores de la prevalencia de determinadas enfermedades o condiciones de una población, así como, el grado de severidad en que se encuentran esas enfermedades (10).

## Características de un índice de medición

Un buen índice reúne las siguientes características:

1. Validez: Que sirva para medir lo que se pretende y que se adapte a las características del problema de estudio.
2. Claridad: El examinador debe entender con facilidad las reglas y criterios a aplicar en el estudio.
3. Fiabilidad: Los resultados deben ser consistentes y reproducibles por distintos examinadores.

4. Sensibilidad: Debe permitir la detección razonable, incluso de pequeñas variaciones.
5. Aceptabilidad de los individuos examinados: No ocasionar molestias en los examinados (10).
6. Manejabilidad estadística: Susceptible de fácil expresión y control estadístico (11).

El estudio epidemiológico fiable o confiable requiere de consistencia diagnóstica por parte del examinador, este debe ser capaz de diagnosticar la misma condición en situaciones distintas. Al igual, durante el trabajo conjunto de varios examinadores es indispensable la unificación de criterios para lograr un grado de consistencia diagnóstica aceptable, el cual debe ser mayor de 90%, aunque dependerá de la complejidad de las mediciones (10).

## CPO y ceo

Klein y Palmer en 1930, establecieron el CPO y así tomaron la pieza dental como unidad de medida. El CPO es el índice odontológico más utilizado y tiene la ventaja de medir el nivel de experiencia de caries en un grupo amplio de población, por lo cual, se usa en estudios transversales (11). Las iniciales de las siglas CPO significan: C, número de dientes permanentes cariados no tratados; P, número de dientes permanentes perdidos por caries; O, número de dientes permanentes obturados o restaurados (10).

El índice ceo se utiliza para conocer la salud dental en niños con dentición temporal o mixta y significa C, número de dientes cariados y no restaurados; E, número de dientes temporales indicados para extraer; O, número de dientes temporales obturados (10).

## Nomenclatura de CPO/ceo

El examen debe efectuarse de forma ordenada, pasando de un diente o espacio dental, al diente o espacio adyacente. Debe considerarse que un diente está presente en la boca cuando cualquier parte de este es visible. Si un diente permanente y otro primario ocupan el mismo espacio dental, debe registrarse el estado del diente permanente(12).

*Tabla 1 Criterios para el diagnóstico y la codificación del Índice CPO/ceo según la OMS*

CLAVE		ESTADO	CRITERIO
ceo	CPO	Sano	Una corona se codifica si no hay muestra de evidencia de caries clínica tratada o no tratada. Las etapas de la caries que proceden a la cavitación, así como otras condiciones similares a las primeras etapas de la caries, se excluyen porque no pueden identificarse de manera confiable en la mayoría de las condiciones de campo en las que se realizan encuestas epidemiológicas.

<b>A</b>	<b>0</b>		
<b>B</b>	<b>1</b>	<b>Caries</b>	Se registra como presente cuando se encuentra una cavidad o fisura en la superficie lisa del diente, esmalte socavado o un piso o paredes suavizado de manera detectable. También se incluye en esta categoría un diente con alguna curación, o uno que esté obturado pero que tenga caries. En los casos en que la corona ha sido destruida por caries y solo queda la raíz, se considera que la caries se originó en la corona y por lo tanto, se califica como caries. Donde exista alguna duda, la caries no debe registrarse presente.
<b>C</b>	<b>2</b>	<b>Corona obturada con caries</b>	Se considera cuando tiene una o más restauraciones permanentes y una o más áreas que están cariadas. Se aplica el mismo código independientemente de si las lesiones cariosas están en contacto con o las restauraciones.
<b>D</b>	<b>3</b>	<b>Corona obturada sin caries:</b>	Se considera cuando hay una o más restauraciones permanentes y no hay presencia de caries en ninguna parte de la corona. A un diente que se le ha colocado corona debido a una caries previa se registra en esta categoría. Un diente que se le ha colocado corona por razones distintas a la caries mediante un pilar de prótesis fija está codificado con el 7.
<b>E</b>	<b>4</b>	<b>Perdida dental debido a caries</b>	Este código se usa para dientes temporales y permanentes que se extrajeron debido a caries. Para los dientes primarios faltantes, este código debe usarse solo si el sujeto está en una edad en la que la exfoliación normal no sería una explicación suficiente para la ausencia. El estado de una raíz de un diente que se ha calificado como perdido debido a la caries debe codificarse con 7 o 9.  En algunos grupos de edad, puede ser difícil distinguir entre dientes no erupcionados (código 8) y dientes faltantes (código 4 o 5). Conocimientos básicos de los patrones de erupción dental, la apariencia de la cresta alveolar en el área del diente en cuestión y el estado de caries de otros dientes en la boca puede proporcionar pistas útiles para decidir si un diente está sin erupción o ha sido extraído. El código 4 no debe usarse para dientes que se consideran faltantes por cualquier motivo que no sea caries. En arcos totalmente desdentados se debe colocar un solo 4
<b>(-)</b>	<b>5</b>	<b>Pérdida dental por otro motivo</b>	Este código se usa para dientes permanentes que se consideran ausentes congénitamente, o se extraen por enfermedad periodontal o por razones de ortodoncia, trauma etc.
<b>F</b>	<b>6</b>	<b>Sellador de fosetas y fisuras</b>	Este código se usa para dientes en los que se ha colocado un sellador de fisuras en la superficie oclusal. Si un diente con sellador tiene caries, debe codificarse como 1.
<b>G</b>	<b>7</b>	<b>Pilar de prótesis dental fija</b>	Este código se usa para indicar que un diente forma parte de un pilar de una prótesis fija. Este código también se puede usar para coronas colocadas por razones distintas a caries y para carillas o laminados que cubren la superficie labial de un diente, en los que no hay evidencia de caries o una restauración. Nota: Los dientes faltantes reemplazados por prótesis dental parcial fija se codifican con 4 o 5.
		<b>Diente sin corona</b>	Esta clasificación está restringida a dientes permanentes y se usa solo para un espacio dental con un diente permanente sin erupción, pero sin diente primario.

(-)	8		
(-)	9	<b>No registrado</b>	Este código se usa para un diente permanente erupcionado que no puede examinarse por ningún motivo, como bandas de ortodoncia, hipoplasia severa etc. (12).

El índice CPO y ceo han sido ampliamente utilizados en estudios epidemiológicos de salud bucal. Es recomendado por la OMS para medir y comparar la experiencia de la caries dental en las poblaciones. Sin embargo, se han descrito algunas limitaciones ya que no identifica el grado de severidad de la lesión, este índice solo se utiliza para identificar la condición del diente y así llevar a cabo el registro y procesamiento estadístico de la información recolectada.

Estudios previos han mostrado que los criterios recomendados por la OMS, aunque en adultos se pueden utilizar sin perder información relevante, en población pediátrica se pierde una cantidad relevante de información, que puede llevar a una subestimación de la caries en esta población (13). En el artículo de Melgar y cols, se comenta que, si la evaluación de caries en la población tiene el objetivo de detener y revertir el proceso de caries a través de la prevención, es importante la identificación de lesiones en una etapa más temprana. Una opción es la utilización del índice ICDAS; sin embargo, consume mucho tiempo, eleva los costos de los estudios epidemiológicos y requiere el uso de aire comprimido para identificar los signos de caries más tempranas (14). Por otra parte, en el estudio de Jordan y cols, donde evaluaron una población pediátrica durante cinco años, encontraron que el uso del índice CPO/ceo sobreestima la frecuencia de caries cuando la prevalencia de extracciones es alta, refieren que al especificar todas las superficies de las coronas / extracciones como cariosas, el índice estima el tratamiento y no la enfermedad (15).

## Saliva

La saliva es uno de los factores más importantes que afectan la homeostasis de la cavidad oral. Es un líquido secretado por las glándulas salivales y su composición y secreción depende de diversos factores entre los que se incluyen, la glándula de la que es secretada,

la edad del paciente, género y tipo de factor estimulante (16). La saliva tiene múltiples funciones:

- Función digestiva: Es realizada por la presencia de las enzimas  $\alpha$ -amilasa salival o ptialina y lipasa lingual, que participan en la digestión de almidón y triglicéridos
- Función de lubricación y protección: La saliva contiene mucinas que son proteínas hidrofílicas, lo que les hace tener la propiedad de humidificar y lubricar los tejidos de la cavidad oral.
- Función antibacteriana de las proteínas salivales: Esta se lleva a cabo por las inmunoglobulinas, al igual las células de los conductos glandulares secretan lisozima y lactoferrina que tiene un efecto bactericida (17, 18).

## Glándulas salivales

Las glándulas salivales son órganos destinados a producir saliva. Estas se caracterizan por verter su producto de secreción en la cavidad bucal. Se pueden clasificar en glándulas salivares mayores y glándulas salivares menores (18).

Las glándulas salivales mayores, extrínsecas o extraparietales, se caracterizan por encontrarse fuera de la cavidad bucal. Estas son las glándulas parótidas, glándulas submandibulares y glándulas sublinguales, cada una en número par a cada lado de la línea media. Son las encargadas de producir entre el 90 y 95% del volumen total de la saliva (18). Tienen una estructura lobular, la mayoría están construidas con segmentos que generan secreción, una capa de células secretoras cuboides envueltas con una densa red de vasos sanguíneos, y tubos que secretan saliva en la cavidad oral (19).

Las glándulas salivales menores intrínsecas o intraparietales, se encuentran al interior de la boca. Las hay labiales, bucales, linguales (Von Ebner's), sublinguales, glosopalatinas y palatinas, dependiendo la zona donde estén alojadas. Las glándulas salivales menores pueden distinguirse histológicamente de glándulas salivales mayores ya que carecen de estructura lobular y cápsula de tejido conectivo (19, 20).

### *Glándula parótida*

Es la más grande de las glándulas salivales, teniendo un peso de 15-30 gramos, produce el 60 - 65% de la saliva total (16). Consiste en una masa de tejido irregular, lobulada y

amarillenta, que se encuentra debajo del conducto auditivo externo, entre la mandíbula y el esternocleidomastoideo; se proyecta hacia adelante sobre la superficie del masetero, donde una pequeña parte, que normalmente esta desprendida, se sitúa entre el arco cigomático por encima y el conducto parotídeo por debajo; esta porción desprendida se denomina porción accesoria de la glándula (17). Esta glándula tiene secreción serosa y expulsa su secreción a la cavidad bucal a través del conducto de Stenon, el cual, tiene una longitud de 4 a 6 cm y un calibre promedio de 3mm. Desemboca en la cara interna de la mejilla a la altura del primer o segundo molar (18, 20).

#### *Glándula submandibular*

Es la segunda en tamaño de las glándulas salivales mayores. Pesa aproximadamente de 7 a 8 gramos. Es la responsable de producir entre el 20 y el 30% de volumen de saliva total. Está ubicada en la región glososuprahioidea, por delante del esternocleidomastoideo y por arriba del vientre anterior del digástrico. Limita hacia fuera con la cara interna del cuerpo mandibular. Se extiende entre el ángulo mandibular y el hueso hioides. Su secreción es de tipo mixto con predominio seroso la cual es vertida al medio oral a través del conducto de Wharton, este mide aproximadamente 4 a 5 cm de longitud con un calibre entre 2 y 4 mm, su recorrido desde la glándula es tortuoso hasta desembocar en el vértice de la carúncula salival, situada a cada lado del frenillo lingual (19, 20).

#### *Glándula sublingual*

Es la más pequeña de las glándulas extraparietales. Produce solo el 2 al 5% de la saliva total. Está situada en el piso de la boca, apoyada sobre el cuerpo mandibular. Hacia la línea media se relaciona con el grupo muscular lingual. Hacia atrás puede llegar a relacionarse con la glándula submandibular. Mide entre 35 y 45 mm, pesa aproximadamente 3gr y su secreción es de tipo mixto con predominio mucoso. Su secreción puede ser expulsada a través de varios conductos que ascienden en forma vertical en número de 10 a 30 para desembocar en varias papilas a lo largo de las carúnculas sublinguales, o puede desembocar en un conducto único llamado conducto de Bartholin (19, 20).

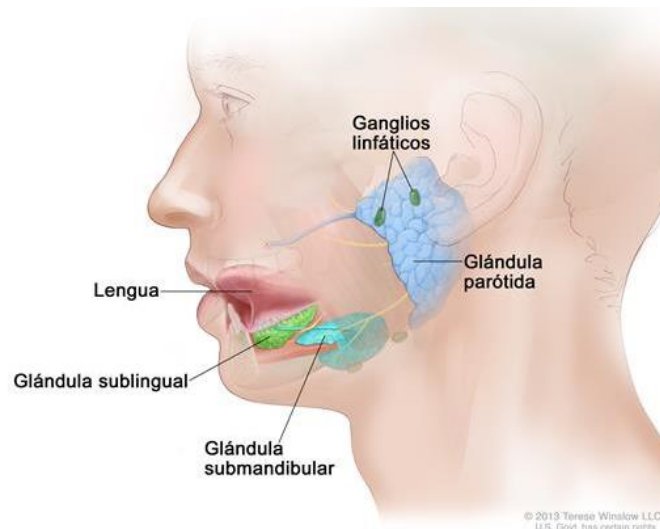


Imagen 1 Localización anatómica de las glándulas salivales mayores.  
 Recuperado de: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/salivary-gland>

## Composición y clasificación de la saliva

La saliva es una solución hipotónica producida por los acinos salivales, líquido crevicular gingival y exudados de la mucosa oral. Aproximadamente el 90% de la saliva es secretada de las glándulas salivales mayores. Las glándulas salivales con mayor permeabilidad están rodeadas de abundantes capilares, sangre y acinos, en donde existe un intercambio activo de moléculas, por este motivo, los biomarcadores en la circulación sanguínea pueden infiltrarse en acinos y eventualmente ser secretados en la saliva. La saliva es incolora, inodora, con un pH de 6.6-7.1. La producción diaria de saliva oscila de 0.5 y 1.5 L (17, 18).

La saliva tiene una composición compleja que incluye urea, amoníaco, ácido úrico, glucosa, colesterol, lípidos neutros, glucolípidos, aminoácidos, hormonas esteroideas, mucina, amilasa, lectina, glucoproteína, lisozima, peroxidasa y lactoferrina. Además, la saliva contiene más de 700 microorganismos relacionados con enfermedades orales y sistémicas (16).

## Como herramienta diagnóstica

La sangre ha sido la herramienta diagnóstica más usada para la detección de enfermedades, sin embargo, se ha demostrado que la saliva contiene diversos

componentes moleculares que pueden ser utilizados como marcadores de enfermedades y que pueden reflejar el estado de salud no solo de las glándulas salivales y la cavidad oral, también de todo el cuerpo (17, 18).

La saliva tiene grandes ventajas como herramienta diagnóstica ya que es un fluido simple de recolectar, no es invasivo, y no expone al personal de salud ante enfermedades transmitidas por la sangre como exposición al VIH o hepatitis. Los fluidos orales también son más fáciles de manejar porque no se coagulan, disminuyendo las manipulaciones requeridas. Además, es posible que los diagnósticos que utilizan saliva se puedan realizar en un entorno no médico, lo cual es atractivo para las personas que no puedan pagar para ver un médico o para personas que viven en lugares donde no hay ninguno. Para los pacientes, las técnicas de recolección no invasivas reduce drásticamente la ansiedad, la incomodidad y simplifica la toma de muestras repetidas para monitoreo del estado general de salud y enfermedad a largo plazo (21).

### **Biomarcadores salivales para el diagnóstico de caries**

La OMS definió biomarcador como: “cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda ser medido en el cuerpo, influir o predecir la incidencia de enfermedad” (22). Muchos de los componentes que se encuentran en la saliva como microorganismos, proteínas, electrolitos son biomarcadores potenciales para enfermedades, estos biomarcadores salivales pueden ser explotados como:

- Herramientas de diagnóstico para la identificación de aquellos pacientes con una enfermedad o condición anormal.
- Herramientas para la estadificación de la enfermedad o clasificación de la extensión de la enfermedad.
- Indicadores del pronóstico de la enfermedad.
- Herramientas para la predicción y el seguimiento de la respuesta clínica a una intervención (23, 24).

### **Perfil microbiano como marcador**

Se han identificado más de 700 especies de microorganismos orales, lo que hace que sea una de las comunidades microbianas más complejas del cuerpo humano. La saliva podría actuar como un fluido oral circulante para transmisión bacteriana y como reservorio para



colonización bacteriana. Las bacterias, incluidas las especies anaerobias, pueden sobrevivir en la saliva y utilizar componentes salivales para su crecimiento. Hay aproximadamente 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/ ml de microorganismos orales que se encuentran en la saliva. Estas especies microbianas salivales reflejan la composición de la comunidad microbiana oral y sirven como biomarcador del estado de salud y enfermedad en la cavidad oral (25).

## Microbiota o microbioma

### Definición

El microbiota humano se refiere al conjunto de microorganismos vivos que se encuentran en una comunidad; como los virus, fagos, plásmidos, priones, viroides no suelen considerarse microorganismos vivos, no se consideran dentro de este concepto. El termino microbioma incluye no solo a la comunidad de los microorganismos, sino también todo el ambiente en el que se desarrollan que involucra todo el espectro de moléculas producidas por estos microorganismos y en este término se incluyen a los virus, plásmidos etc.(Imagen 2) (26).

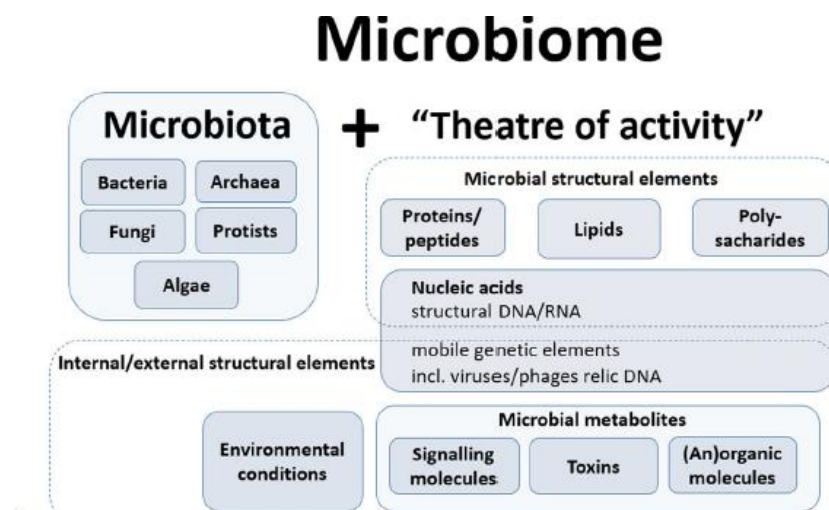


Imagen 2 Microbiota y microbioma (26).

Tanto el microbioma como el microbiota tienen amplias funciones como desarrollo de inmunidad, defensa contra patógenos, nutrición del huésped, son dinámicos y cambian con

el desarrollo de factores ambientales como la dieta, uso de antibióticos y especialmente se encuentran cambios en respuesta a la enfermedad, convirtiéndolo en algo esencial del cuerpo humano (27, 28).

## Microbioma en cavidad oral

Después del intestino, la cavidad oral es la segunda comunidad microbiana más grande del cuerpo humano (27). La cavidad oral tiene dos tipos de superficies en la que las bacterias pueden colonizar: tejidos duros como los dientes y tejidos blandos como las mucosas y la lengua. Esta cavidad proporciona un ambiente ideal para el crecimiento de microorganismos. La temperatura normal de la cavidad oral en promedio es 37°C sin cambios significativos, que proporciona a las bacterias un ambiente estable para sobrevivir, la saliva tiene un pH estable de 6.5-7, el pH favorable para la mayoría de las especies bacterianas, la saliva mantiene a las bacterias hidratadas y sirve como medio para el transporte de nutrientes a microorganismos (29).

La cavidad bucal es un entorno complejo que abarca distintos hábitats microbianos pequeños, como los dientes, la mucosa bucal, paladar y lengua que forman un sistema ecológico heterogéneo rico en especies. Numerosos microorganismos existen en boca, entre las cuales se encuentran bacterias, hongos y virus. Las bacterias son los principales habitantes de la boca, principalmente comprenden las familias *Firmicutes*, *Bacillus*, *Proteobacteria* y *Actinomicetos*. En la boca se pueden encontrar 85 especies de hongos. Entre estos hongos, el más importante es la *cándida*, esta es neutral cuando el microbiota oral es normal; sin embargo, cuando el equilibrio se rompe buscará la oportunidad para atacar al tejido oral. Los virus principalmente los fagos, también forman parte del microbioma oral (29).

Las bacterias son los componentes principales del microbiota oral. Las bacterias orales comunes incluyen a *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivales*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus*. *S mutans* es uno de los principales componentes de la placa dental, asimismo, es el principal patógeno de caries (27).

Tabla 2 Microorganismos asociados a caries dental

Microorganismo	Descripción	Referencias
<b><i>Streptococcus</i></b>	Son cocos Gram positivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, anaerobios facultativos, comprenden parte de la flora microbiana residente en la cavidad bucal y vías respiratorias altas, pero también son oportunistas en enfermedades como la caries dental, endocarditis infecciosa, entre otras.	(30)
<b><i>Lactobacillus</i></b>	Son bacilos gram-positivos, anaerobios facultativos, acidogénicos y acidúricos, pH cercanos a 5 favorecen su crecimiento, así como el inicio de su actividad proteolítica. Algunas cepas sintetizan polisacáridos intra y extracelulares a partir de la sacarosa, pero se adhieren muy poco a superficies lisas, por lo que deben utilizar otros mecanismos para colonizar las superficies dentarias. Entre estos mecanismos podemos mencionar la unión física por atrapamiento en superficies retentivas, tales como: fosas y fisuras oclusales, caries cavitada o coagregación con otras especies bacterianas, constituyendo la biopelícula dental.	(30)
<b><i>Actinomyces</i></b>	Son bacilos filamentosos Gram positivos, anaerobios. Producen una mezcla de ácidos orgánicos, como productos finales tales como: succinato, láctico o acético. Entre los factores que determina su virulencia se considera la presencia de fimbrias, que contribuyen con fenómenos de adhesión, agregación y congregación. La producción de enzimas proteolíticas como la neuraminidasa, esta es de gran importancia cuando las lesiones de caries progresan a la dentina.	(30)
<b><i>Veillonella</i></b>	Son diplococos gramnegativos, anaerobios estrictos, inmóviles que conforman parte de la microbiota bucal y vías respiratorias altas. A pesar de que ofrece una pobre adherencia directa a los tejidos del hospedero de la cavidad bucal, su presencia en grandes cantidades en placa dental subgingival, supragingival y superficies mucosas, se debe a mecanismos de coagregación. Su presencia se relaciona con el mantenimiento de la homeostasis y la capacidad de neutralizar ácidos producidos por los microorganismos cariogénicos.	(30)

En la tabla 2 se muestran algunos estudios realizados sobre microorganismos encontrados en la saliva como posibles biomarcadores de caries. Como la caries es una enfermedad

infecciosa, la colonización, proliferación y metabolismo cariogénico ha sido ampliamente estudiado para identificar individuos propensos a caries (27).

### Factores que modifican el microbioma

Existen diferentes factores que modifican o causan un desequilibrio en el microbioma. Los principales son el estilo de vida que lleva el huésped, desde la dieta (consumo frecuente de sacarosa), tabaquismo y uso de antimicrobianos (31-34). En un estudio reciente se evaluaron factores sociodemográficos, estudiaron 282 individuos. Encontraron que 69 OTUs tienen una diferencia en abundancia para variables sociodemográficas, 27 por raza/etnicidad, 21 por ingreso familiar, 19 por educación, y 3 por sexo. Por otra parte, encontraron 49 OTUs asociados a tabaquismo, 12 a hábitos de salud bucal. Los géneros que se encontraron asociados a estas diferencias fueron *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*. También se han identificado factores sociales como hacinamiento en el hogar y el uso del transporte público. Así como cambios en la función inmunológica relacionados con el estrés psicosocial y la nutrición (33). También las redes sociales selectivas y los entornos construidos compartidos pueden representar reservorios de miembros compartidos del microbiota (35). Por lo tanto, en el diseño de los estudios de microbioma oral es importante evaluar estas variables que pueden influenciar los resultados de los estudios.

## Metagenómica o metataxonomía

### Definición

La metagenómica es un campo de investigación que combina la genética molecular, ecología bucal y análisis de datos. El objeto central de estudio es el genoma total de los organismos y virus presentes en una muestra ambiental. La metagenómica se basa en métodos de identificación bacteriana independientes del cultivo, lo que significa que permite detectar la totalidad de los microbios, o sea el microbiota, incluso las especies que no pueden ser aislados y cultivados utilizando técnicas microbiológicas existentes. La finalidad de la metagenómica es comprender la composición y el funcionamiento de conjuntos complejos microbianos en muestras ambientales a través, de la secuenciación y análisis de su ADN (36, 37).

La metataxonomía se refiere a la secuenciación de genes marcadores, normalmente regiones del gen del ARN ribosómico (ARNr) que está altamente conservado entre los taxones. Las secuencias del gen del ARNr son las más utilizadas como marcadores; entre ellas el gen 16S ARNr para las bacterias, 18S ARNr para los eucariotas y las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ribosoma fúngico para los hongos. Estos marcadores funcionan para la elaboración de perfiles filogenéticos porque están presentes de forma generalizada en la población, tienen regiones hipervariables que diferencian las especies y están rodeados por regiones conservadoras a las que se pueden unir cebadores universales (38, 39).

En años anteriores se ha tenido una confusión sobre el uso de algunos términos, ya que el término de metagenómica se usó para la secuenciación de genes marcadores. Sin embargo, la metagenómica se refiere a la secuenciación aleatoria del ADN microbiano, sin seleccionar ningún gen en particular. Tanto la metataxonomía como la metagenómica pueden brindar información sobre la composición de especies de un microbioma (39).

### Ventajas como herramienta para el estudio del microbiota

La metataxonomía es un enfoque recientemente desarrollado para investigar el microbiota humano ya que la mayoría de los microorganismos presentes en nuestro cuerpo son anaeróbicos y no se pueden cultivar fácilmente por métodos clásicos. Dado los avances de la metataxonomía y las plataformas de secuenciación se han abierto oportunidades para que los investigadores revelen la riqueza del microbiota previamente no observada en nichos, desde suelos y océanos hasta entornos urbanos y microbiota asociada al huésped. En particular, el microbiota humano es de gran interés para el descubrimiento de biomarcadores de enfermedades (36, 40).

### Estudios de metataxonomía y caries

Se han realizado múltiples estudios sobre metataxonomía y caries, teniendo como finalidad encontrar bacterias que se relacionen con esta enfermedad. En 2005 Corby y cols realizaron un estudio en 408 pacientes con un rango de edad de 1.5 a 7 años, se dividieron en grupos con caries y sin caries. Se recolectaron muestras de placa supragingival, al grupo libre de caries se les tomó muestras de dientes superiores y posteriores. Al grupo de pacientes con caries se les tomaron las muestras de cuatro tipos de superficies: superficies del esmalte intacto (sitio 1), superficie de lesiones de mancha blanca (sitio 2), superficie de

las lesiones iniciales del esmalte (sitio 3) y lesiones con dentina expuesta (sitio 4) posteriormente se analizaron las muestras por medio de PCR para amplificar el gen 16S rRNA. Se encontraron un gran número de *S. mutans* en pacientes con caries, el grupo de *Lactobacillus* fueron encontrados con alta frecuencia en pacientes con caries activas y en un paciente libre de caries, también se encontraron *Actinomyces spp* pero en una abundancia significativa en pacientes con caries y sin caries y los *Actinomyces sp.* Strain B19SC se encontraron en niveles muy altos y fue significativamente abundante en sujetos con caries activa en relación con sujetos sin caries. Llegando a la conclusión que el microbiota asociado a caries es dominada por bacterias grampositivas, particularmente de los géneros *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, predominantemente *Streptococcus mutans*(41).

En 2008 Aas y cols realizaron un estudio con dos grupos diferentes de pacientes: el primero fue pacientes con dentición primaria 15 sujetos con caries y 14 controles y el segundo grupo fue en pacientes con dentición permanente 36 sujetos con caries y 25 controles, con un rango de edad de 2 a 21 años. Se tomaron diferentes muestras de placa dental de diversas zonas de los dientes, desde superficies lisas, manchas blancas y lesiones cariosas que abarcaban dentina. Posteriormente se procesaron las muestras y se amplificó el gen 16S por PCR, teniendo como resultados que *S. mutans* están presentes en pacientes que tienen lesiones cariosas que abarcaban dentina (42).

En 2017 Belstrom y cols, realizaron un estudio en donde se recolectaron muestras de saliva estimulada de 30 pacientes, 10 con caries, 10 con enfermedad periodontal y 10 controles, con la muestra de saliva obtenida se realizó metagenómica y metatranscriptómica. El análisis metagenómico identificó un total de 391 especies bacterianas, 264 constituían el microbioma salival central, y la mayoría de las especies bacterianas 84.9% se compartieron entre muestras de casos y controles. Los patógenos periodontales tradicionales como *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra* y *F. alocis* y bacterias cariogénicas, incluidas *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* fueron identificados con abundancia relativa significativamente mayor en las muestras de pacientes con periodontitis y caries dental, respectivamente, según los enfoques metagenómicos. Los autores llegaron a la conclusión que estas bacterias pueden poseer un potencial como biomarcadores pero se necesitan estudios adicionales con mayor profundidad de secuenciación y un tamaño de muestra más grande (43).

Tabla 3 Estudios de metataxonomía en Caries

Estudio	Tipo de muestra	Anormalidad	Referencias
<b>Microbial risk indicators of early childhood caries.</b>	Placa dental	<i>S. mutans</i> : Se presentó en forma abundante en sujetos que presentaban caries y poco abundante en pacientes sin caries <i>Lactobacillus</i> : Fueron encontrados con alta frecuencia en sujetos con caries activa y solo se encontró en 1 sujeto libre de caries. <i>Actinomyces spp</i> : Se encontraron en abundancia tanto en sujetos con caries activa como sin caries	(41)
<b>Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults</b>	Placa dental	Se detectaron <i>S. mutans</i> en pacientes con lesiones de caries que abarcaban dentina	(42)
<b>Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with caries</b>	Saliva estimulada	En individuos con caries se encontraron mayor cantidad de <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus sp</i> Individuos con periodontitis se encontraron mayor cantidad de <i>F. alocis</i> , <i>P. gingivalis</i> . Mientras que en los controles se encontró bajos niveles de <i>S. Mutans</i> y <i>P. gingivalis</i>	(43)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que existe evidencia que el índice CPO/ceo tiene ciertas limitaciones al evaluar la gravedad de la lesión y también se tiene evidencia sobre el uso del microbiota oral como biomarcador en saliva para caries, y que dependiendo la gravedad de la lesión se van a presentar, aumentar o disminuir ciertos microorganismos

Nos hacemos la pregunta: ¿Existe una relación entre los resultados del índice y los perfiles microbianos de la saliva en pacientes pediátricos?

### 4. JUSTIFICACIÓN

La caries es la enfermedad bucal más frecuente en población pediátrica mexicana y se considera un problema de salud pública, para poder diagnosticarla, registrarla y tener un procesamiento estadístico se necesitan de los índices bucales, existen múltiples índices bucales los cuales están diseñados para ser utilizados en diferentes situaciones. El índice más utilizado para estudios epidemiológicos sobre caries es el CPO/ceo, este es un índice que mide la experiencia de caries en individuos, aunque no el grado de severidad de la lesión. El uso del índice ICDAS tiene desventajas que incluyen el tiempo, costos, y el uso de aire comprimido (14). En diferentes estudios se ha observado que los microorganismos presentes en lesiones cariosas varían según el grado de severidad de la lesión, estos perfiles pueden ser identificados en muestras de saliva y pudieran ser utilizados como biomarcadores en estudios epidemiológicos para ayudar en la identificación de lesiones cariosas cuando se utiliza el índice CPO/ceo.



## 5. OBJETIVOS

### GENERAL

- Relacionar los puntajes del índice CPO y ceo con los resultados del análisis metataxonómico de saliva en pacientes pediátricos.

### ESPECIFICOS

- Evaluar el nivel de caries en pacientes pediátricos por medio del índice CPO y ceo.
- Determinar a través de las muestras de saliva los perfiles microbianos de los mismos pacientes.
- Identificar la posible relación entre los perfiles microbianos y la puntuación del índice CPO y ceo.

## 6. HIPÓTESIS

La puntuación del índice CPO y ceo se relacionará con los perfiles microbianos. El nivel de la relación se establecerá con los valores obtenidos en el índice y la presencia de diferencias significativas de los perfiles microbianos.

## 7. METODOLOGIA

### DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio es de tipo observacional, analítico, transversal, retrospectivo de casos y controles.

### DEFINICION DE VARIABLES

- Independientes:
  - Experiencia de caries
- Dependientes:
  - Perfiles bacterianos
- Covariables:
  - Dieta
  - Medicamentos
  - Higiene bucal
  - Diagnóstico de cáncer

Todas las variables que se analizaron en este estudio se pueden revisar en el anexo 1.

### PARTICIPANTES

#### CASOS

En este estudio se incluyeron un total de 15 casos, los cuales eran individuos menores de 18 años que al momento de la exploración presentaron un índice CPO mayor a 1, que acudieron al servicio de la Clínica de Odontopediatría del Posgrado de la Facultad de Odontología, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y escuelas, con previo consentimiento informado de los padres y asentimiento de los pacientes. El estudio fue autorizado por los comités de bioética de las instituciones participantes.

#### CONTROLES

Se incluyeron en el estudio 19 controles, los cuales era individuos menores de 18 años que al momento de la exploración presentaron un índice CPO de 0, que acudieron al servicio

de la Clínica de Odontopediatría del Posgrado de la Facultad de Odontología, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y escuelas, con previo consentimiento informado de los padres y asentimiento de los pacientes. El estudio fue autorizado por los comités de bioética de las instituciones participantes.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

<b>CASOS</b>	<b>CONTROLES</b>
Grupo de pacientes con experiencia a caries	Grupo de pacientes sin experiencia a caries
Sexo: Masculino o femenino	Sexo: Masculino o femenino
Edad: De 3 a 17 años	Edad: de 3 a 17 años
Índice CPO >1	Puntuación de índice CPO = 0

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- índice CPOD incompleto
- Falta de consentimiento/asentimiento informado

### CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestra de saliva insuficiente
- Muestra con concentración o calidad insuficiente de ADN bacteriano
- Deseos de no continuar en el estudio

## Toma de muestra, procesamiento y almacenamiento

Para la recolección de la muestra el personal fue calibrado como lo indica Wong y cols. La recolección de saliva se realizó entre las 9 y 12 de la mañana, una hora antes de la recolección de la muestra los pacientes evitaron consumir alimentos o bebidas, cepillar los dientes y se verificó el estado de hidratación. Se les pidió hacer un enjuague previo con agua desionizada por 60 segundos, el paciente se sentó e inclinó la cabeza permitiendo la acumulación de saliva en el piso de boca y después escupió en el tubo Falcon de 50 mililitros que se mantiene en hielo hasta coleccionar aproximadamente 5 mililitros de saliva.

La muestra se mantuvo a 4 °C máximo 40 minutos al momento de la toma de muestra. Se le indicó al paciente que evitará toser. Finalmente, la muestra se mantuvo a 4 °C para su traslado al laboratorio.

## Exploración Bucal

Se realizó la exploración bucal, se examinaron todos los tejidos blandos del paciente y se registró la información en la hoja de recolección de datos, posteriormente se realizó el índice CPO con ayuda de una sonda tipo OMS y un abatelenguas. Se comenzó en el cuadrante superior derecho, examinando cada diente de distal a mesial y finalmente se registraron los códigos en el odontograma asignado para cada paciente.

## Procesamiento de Muestras de Saliva

Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio de genómica clínica y se procesaron mediante centrifugación a 2600g por 15 minutos, terminado el tiempo de centrifugación se separaron el sobrenadante y pellet, (los crioviales de pellet se agrega 10uL de PBS), en sus respectivos crioviales previamente rotulados con el número para su identificación, el cual también se colocó en la hoja de recolección de datos. Todas las muestras fueron almacenadas a -80C para su posterior uso.

## Extracción del DNA bacteriano y controles de calidad

Para la extracción del DNA bacteriano se utilizó el kit DNeasy UltraClean Microbial kit (QIAGEN), catálogo 12224-250.

Se eligió la muestra de pellet y se tomó 200uL, se incubó en thermoblock por 10 minutos a 55°C. Se colocó la muestra en el tubo con perlas y se dio vórtex por 10 minutos.

Posteriormente se diluyó con 40 µL de agua destilada libre de DNAsas/RNAsas (UltraPure™ de Invitrogen) Precaentada a 55°C, se dejó reposar 5 min, se centrifuga 100X100g por 2 minutos para finalmente recuperar todo el volumen (aproximadamente 40 µL).

Una vez obtenido el ADN bacteriano de cada muestra, se realizó la primera cuantificación con el equipo NANODROP 2000 (Thermo Scientific) para determinar la concentración en nanogramos, la pureza (absorbancia 260/280) y si existe la presencia de contaminantes (absorbancia 230/260). La segunda cuantificación se realizó mediante el equipo Qubit 3.0, ya que este equipo tiene la capacidad de analizar exclusivamente el DNA de doble cadena (dsDNA). Para evaluar la integridad del material genético bacteriano se llevó a cabo la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Invitrogen)

## Preparación de librerías

### Amplificación por PCR

Reacciones	
Componente	Volumen
ADN microbiano (5ng/)	2.5µL
Amplicon PCR Forward Primer 1	5µL
Amplicon PCR Reverse Primer 1	5µL
2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12.5µL
Total	25µL

### Condiciones PCR

Temperatura		Tiempo
95 °C		3 minutos
25 ciclos	95°C	30 segundos
	55°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
	72°C	5 minutos
4°C		Fijo

Al concluir, se sacó del termociclador y se dio un spin para precipitar el líquido condensado.

Posteriormente 1  $\mu$ L de productos de PCR se bioanalizó en el chip DNA 1000 para verificar el tamaño de fragmentos (usando los cebadores V3 y V4 del gen 16S bacteriano, se obtuvieron amplicones de 550 pb).

## Limpieza de librerías

Las perlas de AMPure XP fueron previamente atemperadas por lo menos 30 minutos, se centrifugó la placa de PCR o tiras de tubos a 1000 x g a 20°C por un minuto para precipitar el líquido. Se transfirió 25 mL de cada pozo de reacción a la placa MIDI. Se vortexeo las perlas AMPure XP por 30 segundos para dispersarlas, se agregan 20 mL de perlas AMPure XP a cada pozo de reacción y mezclar por pipeteo 10 veces.

Se vortexeo en el bioshake a 1800rpm durante 2 minutos usando la placa MIDI, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente se eliminó con mucho cuidado la tapa adhesiva y se colocan las microplacas o tiras de microtubos en la placa de separación magnética hasta que se formara el pellet de perlas y el sobrenadante translucido. Se eliminó el sobrenadante de cada pozo de reacción sin perturbar a las perlas y se cambió la punta en cada muestra. Se agregaron 200  $\mu$ L de etanol al 80%, previamente preparado, a cada pozo de reacción. Se incubo por 30 segundos y se cambió el sentido de la placa para hacer pasar las perlas hasta la pared opuesta del pozo, se esperó a que se formara un pellet y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Se realizó un nuevo lavado siguiendo las indicaciones anteriores, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por no más de 10 minutos. Es importante evitar un sobre secado. Se retiraron las placas o tiras de tubos de la placa de separación magnética y se agregan 52.5mL de Tris 10mM pH 8.5 a cada pozo. Se homogenizó por pipeteo durante 10 veces. Se selló la placa o tiras de tubos dependiendo el caso y se vortexeo 1800 rpm durante 2 minutos. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se colocaron nuevamente en la placa o tiras de tubos en la placa de separación magnética. Se espero 2 minutos o hasta que se formara el pellet con perlas. Se etiquetó una nueva placa o tira de tubos y trasfirió 50  $\mu$ L de sobrenadante del paso anterior. Es importante cambiar la punta de cada muestra para evitar la contaminación cruzada. Si no se procede de manera inmediata con la ligación de los índices, las muestras debían de almacenarse en congelación (-15°C a -25°C) hasta por una semana.

## Ligación de índices

En este paso se unieron los índices y adaptadores de secuenciación.

Se comenzó transfiriendo 5µL del producto de PCR de cada muestra a una placa nueva, los 45µL restantes no se usan en este protocolo. Para mezclar los índices, se recomienda organizarlos en el True Seq index Plate de la siguiente manera (Fig. 2):

- Los tubos de primer 2 (tapas blancas, solución transparente) de manera vertical, alineados de las filas A-H.
- Los tubos de primer 1 (tapas naranjas, solución amarilla) de manera horizontal, alineados de las columnas 1-12

Se colocó la placa de PCR de 96 pozos con 5µl del producto de PCR resuspendido en el accesorio de placa de índice TruSeq

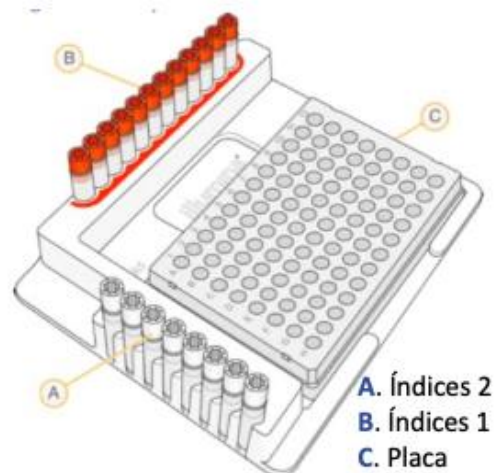


Imagen 3 Indices.

## Ligación de índices

Se preparó la mezcla para adaptadores

Componente	Volumen
Amplicones	5 µL
Nextera XT Index Primer 1(N7 xx)	5 µL
Nextera XT Index Primer 2(S5 xx)	5 µL
2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix	25 µL
Agua grado PCR	10 µL
Total	50 µL

Se homogenizó por pipeteo 10 veces, se selló la placa o tira de tubos y se centrifugó a 1000 x g a 20°C durante un minuto.

Condiciones de PCR para ligación:

<b>Temperatura</b>		<b>Tiempo</b>
	95 °C	3 minutos
8 ciclos	95°C	30 segundos
	55°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
	72°C	5 minutos
	4°C	Fijo

## Segunda limpieza

Se centrifugó la placa de PCR o tiras de tubos a 280x g a 20°C por un minuto para precipitar el líquido. Se transfirió 50mL de cada pozo de reacción a la palca MIDI (solo si se pretende utilizar bioshake XP), se dio vortex a las perlas AMPureXP por 30 segundos para dispersarlas, se agregaron 56mL de perlas AMPure XP a cada pozo de reacción y se mezcló por pipeteo 10 veces. Se cambió de punta entre cada muestra. Se sellaron las placas. Se dio vortex en el bioshake a 1800 rpm durante 2 minutos usando la placa MIDI, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, se eliminaron con mucho cuidado la tapa adhesiva o tiras de tapas y se colocaron las microplacas o tiras de microtubos en la placa de separación magnética hasta que se formó el pellet de perlas y el sobrenadante esté translucido. Se eliminó el sobrenadante de cada pozo de reacción sin perturbar las perlas y cambiando la punta en cada muestra.

Se agregó 200mL de etanol al 80%, previamente preparado, a cada pozo de reacción. Se incubó por 30 segundos y se cambió el sentido de la placa para hacer pasar las perlas hasta la pared opuesta del pozo, se esperó hasta que se formó un pellet y se elimina nuevamente el sobrenadante.

Se volvió a realizar un nuevo lavado siguiendo las anteriores indicaciones.

Posteriormente se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por no más de 10 minutos.

Se retiraron las placas o tiras de tubos de placa de separación magnética y se agregan 27.5 mL de Tris 10 mM pH 8.5 a cada pozo. Se homogenizó mediante pipeteo 10 veces. Se selló la placa o tiras de tubos y se dio vortex a 1800 rpm durante 2 minutos. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se colocó nuevamente la palca o tiras de tubos en la placa de separación magnética. Se esperó 2 minutos o hasta que se formó el pellet con las perlas.



Se etiquetó una nueva placa o tira de tubos y se transfirió 25 mL del sobrenadante del paso anterior. Como punto de control de calidad, 1 mL de una dilución 1:50 de la librería final se bionalizó en el chip DNA 1000 para verificar el tamaño de fragmentos. Usando los cebadores V3 y V4, se esperan amplicones de 630 pb aproximadamente.

## Cuantificación, normalización y agrupación

Por recomendaciones de Illumina se cuantificó las librerías por fluometría a través de colorantes de unión de dsDNA.

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

Obtenida la concentración final de cada librería, se realizó la dilución correspondiente con buffer de resuspensión (RBS) o 10 mM Tris pH8.5 para obtener una concentración final de 4nM. Se tomó 5µL de la alícuota diluida de cada biblioteca para mezclarlas.

## Desnaturalización y cargado

Las librerías agrupadas se desnaturalizaron con NaOH diluido con el buffer de hibridación, y después, desnaturalizado por calor previo a la secuenciación en el MiSeq. Cada corrida incluyó un mínimo de 5% de PhiX como control interno de bibliotecas de baja diversidad.

Para la preparación se calentó el termobloque a 96°C con el adaptador de microtubos de 1.7mL, posteriormente se sacó del congelador el cartucho de secuenciación MiSeq, se descongeló a temperatura ambiente y se preparó agua helada mezclando 3 partes de hielo con una de agua.

Se combinaron los siguientes volúmenes:

Componente	Volumen
Librería agrupada 4nM	5 mL
NaOH 0.2N	5 mL
Total	10 mL

Se vortexó la mezcla 30 segundos y se centrifugó a 280 x g a 20°C por un minuto, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar en cadenas sencillas, agregar 990 mL de HT1 pre enfriado al tubo con los 10 mL de librerías previamente desnaturalizadas y se conservó en hielo hasta que se procedió la dilución final.

## Dilución del DNA desnaturalizado

Se diluyó el DNA 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

*Imagen 4 Cálculo de dilución*

Se invirtió varias veces para mezclar y luego se centrifugó por pulsos la solución de ADN y posteriormente se coloca el DNA desnaturalizado y diluido en hielo.

## Desnaturalización y dilución del control PhiX

Se combinó los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca PhiX a 4 nM:

- 10 nM PhiX library (2 µl)
- 10M Tris pH 8.5 (3 µl)

Posteriormente se combinó los siguientes volúmenes de PhiX 4 nM y NaOH 0,2 N en un tubo de microcentrífuga:

- 4 nM PhiX library (5 µl)
- 0.2 N NaOH (5 µl)

Ya combinados se dio vortex brevemente para para mezclar la solución de la biblioteca PhiX 2 nM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la biblioteca PhiX.

Se agregaron los siguientes volúmenes de HT1 pre enfriado al tubo que contiene PhiX desnaturalizado biblioteca para dar como resultado una biblioteca PhiX de 20 pM:

- Biblioteca PhiX desnaturalizada (10 µl)
- HT1 pre enfriado (990 µl)

Se diluyó la biblioteca PhiX al 30% a la misma concentración de carga que la Biblioteca de amplicones de la siguiente manera:

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

*Imagen 5 Carga de biblioteca*

Finalmente se centrifugó por pulsos la solución de ADN y se coloca el PhiX desnaturalizado y diluido en hielo.

## Combinación de amplicones de librerías y control PhiX

Se combinaron los siguientes volúmenes de biblioteca de control PhiX desnaturalizada y su biblioteca de amplicones en un tubo de microcentrífuga:

- Control PhiX desnaturalizado y diluido (30 µl)
- Biblioteca de amplicones desnaturalizados y diluidos (570 µl)

Se dejó la biblioteca de muestras combinada y el control PhiX a un lado en hielo hasta que estuvieran listos para desnaturalizar la mezcla con calor inmediatamente antes de cargarla en el reactivo MiSeq v3 cartucho, con un bloque de calor y se incubó la biblioteca combinada y el tubo de control PhiX a 96 ° C durante 2 minutos. Después de la incubación, se invirtió el tubo 1 o 2 veces para mezclar y colocar inmediatamente en el agua fría. Se mantuvo el tubo en el baño de agua helada durante 5 minutos.

## Análisis de datos y estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante tablas de frecuencia con el programa SPSS V.22. Posteriormente los gráficos de barras y boxplots se realizaron con el programa SPSS V.22 y el mapa de calor (heatmap) con el programa Microsoft Office Excel.

Se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas (t de student, U de Mann-Whitney, Chi-cuadrado de Pearson y prueba exacta de Fisher) dependiendo del tipo de variables para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Un valor de p menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

## 8. RESULTADOS

### PARTICIPANTES

Todos los individuos que participaron en el estudio fueron reclutados de los siguientes institutos: Clínica de Odontopediatría del DEPEl de la Facultad de Odontología, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y escuelas.

### ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Se seleccionaron un total de 34 individuos: 15 con experiencia a caries (casos) y 19 sin experiencia a caries (controles). La media de edad de los casos fue de 11.60 y para los controles de 12.32 sin encontrar diferencias significativas entre los grupos ( $p=0.584$ ) (Imagen 6).

De los casos se presentaron 5 hombres y 10 mujeres, para los controles fueron 13 hombres y 6 mujeres. (Imagen 6). El lugar de nacimiento más frecuente para los dos grupos fue la Ciudad de México, al igual que el lugar de residencia. Respecto al nivel socioeconómico no fue estadísticamente significativo para los grupos ( $p=0.720$ ), en estudios previos se ha demostrado que existe una relación entre el nivel socioeconómico y la experiencia de caries. Schwendicke F y cols., llegan a la conclusión de que un nivel socioeconómico bajo se relaciona con un mayor riesgo de sufrir lesiones o experimentar caries, esto debido principalmente a la falta de recursos para poder acceder a servicios odontológicos e incluso para poder obtener elementos básicos para una higiene oral adecuada (44).

En otro estudio Frechero y cols. comparan a 362 niños de México, los cuales los clasifican según su nivel socioeconómico en los que se observa que la experiencia de caries fue más frecuente entre los niños de la zona donde el nivel socioeconómico es bajo y llegan a la conclusión que la frecuencia de caries dental se asocia al nivel socioeconómico de la familia (45).

En la tabla 4 se muestran los datos mencionados anteriormente

*Tabla 4 Datos sociodemográficos.*

<b>VARIABLE</b>		<b>CASO (15)</b>	<b>CONTROL (19)</b>	<b>VALOR P</b>
<b>EDAD</b>	Media D.E Min. Max	11.60 3.481 6-16	12.32 3.351 6-17	0.584

<b>SEXO</b>	Masculino Femenino	5 (45.94%) 10 (54.05%)	13 (66.6%) 6 (33.3%)	0.42
<b>NACIMIENTO</b>	CDMX Guerrero Edo México Tamaulipas	11 0 3 1	15 1 3 0	0.812
<b>RESIDENCIA</b>	CDMX Edo. México	8 6	14 4.	0.267
<b>NIVEL SOCIOECONOMICO</b>	A/B C+ C C- D+ D	1 4 0 4 3 4	1 3 2 2 1 5	<b>0.720</b>

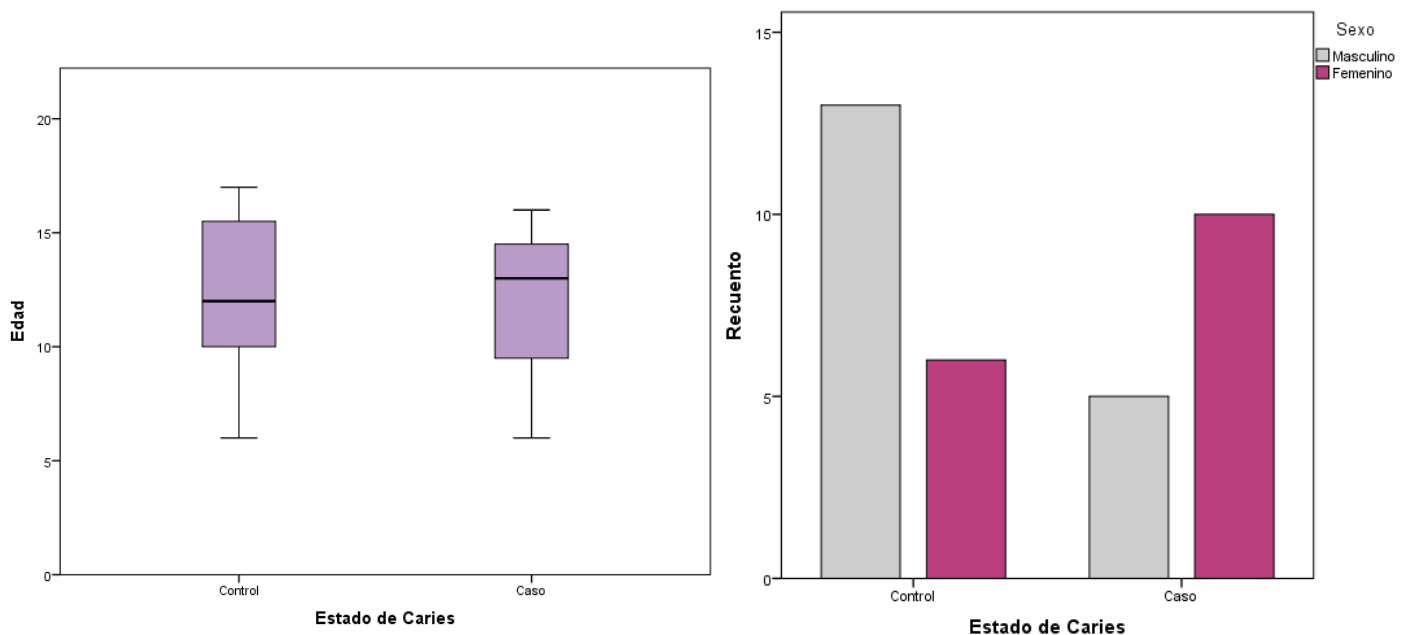


Imagen 6 Gráficos donde se muestra la edad y sexo para casos y controles.

Los datos sobre la toma de muestra (tabla 5) son importantes ya que para recolectar una muestra de saliva se necesitan de ciertas condiciones en el paciente como lo indica Wong y cols., esto para guardar la integridad de la muestra, evitando que se contamine con restos de comida o algún otro material y pueda afectar la composición de la saliva. Los datos de este apartado no fueron estadísticamente significativos en este estudio. ( $p > 0.05$ ) (Tabla 5).

Tabla 5 Datos de toma de muestra.

VARIABLE		CASO (15)	CONTROL (19)	VALOR P
LUGAR DE RECOLECCIÓN	INP	2	5	0.178
	Clínica de Odontopediatría UNAM	1	5	
	Centro médico 20 de Noviembre	8	2	
	Escuela/Colegio	4	6	
	Clínica admisión UNAM	0	1	
Otro				
ENJUAGUE BUCAL	Si	13	18	0.119
	No	2	0	
DURANTE LA ÚLTIMA HORA A CONSUMIDO ALIMENTOS, BEBIDAS, A REALIZADO HIGIENE ORAL	Si	0	1	1.00
	No	15	15	
HORA	(8:00-9:00)	0	0	-
	(9:00-12:00)	15	19	

Sobre los antecedentes patológicos al nacimiento no se encontró algún tipo de asociación al igual que en los antecedentes por aparatos y sistemas, no fueron significativos ( $p > 0.05$ ). Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Datos de antecedentes patológicos.

VARIABLE		CASO (15)	CONTROL (19)	VALOR P
MEDICAMENTOS DURANTE EL EMBARAZO	Si	3	3	1.00
	No	10	12	
TIPO DE ALUMBRAMIENTO	Parto eutócico	4	6	0.199
	Parto distócico	3	0	
	Por cesárea	6	9	
ETAPA NEONATAL	Prematuro	2	2	1.00
	A término	11	12	
	Post-término	0	1	

<i>DIFICULTAD AL NACER</i>	Hipoxia Dificultad de succión Ninguna Otra	0 1 11 1	1 0 13 1	0.856
<i>ANOMALÍAS CONGÉNITAS</i>	Si No No contesto	2 10 1	0 15 0	0.87
<i>ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER</i>	Si No	10 5	8 11	0.154
A. <i>EXANTEMÁTICAS</i>	Varicela No	10 5	12 6	1.00
A. <i>ALERGICOS</i>	Si No	2 13	4 15	0.672
A. <i>NEUROLÓGICOS</i>	Si No	0 15	1 18	1.00
A. <i>CARDIOVASCULARES</i>	Si No	2 13	0 19	0.187
A. <i>RESPIRATORIOS</i>	Si No	2 13	1 18	0.571
A. <i>GASTROINTESTINALES</i>	Si No	4 11	1 18	0.146
A. <i>MUCULOESQUELÉTICOS</i>	Si No	2 13	2 17	1.00
A. <i>ENDOCRINOS</i>	Si No	0 14	1 18	1.00
A. <i>DERMATOLOGICOS</i>	Si No	2 13	2 17	1.00
A. <i>GENITOURINARIOS</i>	Si No	0 15	0 19	-
A. <i>HEMOLINFATICOS</i>	Si No	0 15	0 19	-
A. <i>ONCOLOGICOS</i>	Si No	0 15	0 19	-
A. <i>PSICOLÓGICOS</i>	Si No	0 15	0 19	-



A. QUIRURGICOS	Si No	3 12	2 17	0.634
A. TRAUMATICOS	Si No	3 12	1 18	0.299

Los datos obtenidos sobre higiene bucal y alimentación no han sido significativos ( $p > 0.05$ ), sin embargo, en otros estudios se ha relacionado la alimentación nocturna ( $p = 0.142$ ), leche endulzada ( $p = 0.102$ ), el cepillado de dientes ( $p = 0.610$ ) con la experiencia a caries (46). Los datos se muestran en la tabla 7.

*Tabla 7 Datos de higiene bucal y alimentación.*

VARIABLE		CASO (15)	CONTROL (19)	VALOR P
LECHE ENDULZADA	Si No	10 3	7 8	0.102
ALIMENTACIÓN NOCTURNA	Si No No contestó	6 7 2	11 4 4	0.142
HIGIENE BUCAL DEL PACIENTE	Si No	15 0	19 0	-
PERSONA QUE REALIZA LA HIGIENE BUCAL DEL PACIENTE	Paciente Ambos No contestó	10 3 2	14 1 3	.311
AUXILIARES DE HIGIENE BUCAL	Cepillo dental Gasa Pasta	12 1 0	14 0 1	0.722
FRECUENCIA CON LA QUE REALIZA LA HIGIENE BUCAL	Una vez al día Dos veces al día Tres veces al día No contestó	2 10 1 2	3 10 1 4	0.610
INICIO DE HIGIENE BUCAL	Antes de la erupción dental A la erupción de los dientes primarios	1 11 1	5 8 2	0.227

	A la erupción de los dientes secundarios No contesto	2	4	
<i>REALIZA HIGIENE BUCAL ANTES DE DORMIR</i>	Si No No contesto	8 3 4	10 4 5	1.00

Referente a los datos obtenidos a la exploración bucal, hábitos perniciosos y riesgos a caries (tabla 7) . En el aspecto de hábitos perniciosos los datos no han sido significativos ( $p>0.05$ ) al igual que riesgo a caries ( $p=0.71$ ) (Imagen 7), para poder valorar el riesgo a caries realizamos un interrogatorio y una inspección bucal que permite valorar algunos de los factores más importantes para desarrollar caries como es la frecuencia del consumo de sacarosa, el número de veces de cepillado dental con pasta, morfología dental, obturaciones defectuosas, caries en padres y hermanos, alteraciones del esmalte (opacidades, hipoplasia, defectos, fluorosis) y presencia de aparatología ortodóntica . Con el puntaje obtenido se clasificaron en un riesgo alto, medio y bajo.

En diferentes estudios se ha observado que el riesgo a caries está relacionado con la presencia de esta enfermedad (47). Padilla Suzuki y cols. realizaron un estudio donde analizaron el riesgo de caries y evaluaron la frecuencia en 583 niños del noroeste de México y se observó que a mayor número de dientes afectados el riesgo de caries aumenta (48).

*Tabla 8 Datos exploración bucal, hábitos perniciosos y riesgo a caries.*

<b>VARIABLE</b>		<b>CASO (15)</b>	<b>CONTROL (19)</b>	<b>VALOR P</b>
<i>INSPECCIÓN SUPERFICIE INTERNA DE LABIOS</i>	Labio superior e inferior sin alteración	15	19	-
<i>INSPECCIÓN DE FRENILLO LABIAL</i>	Frenillo labial superior e inferior con inserción normal	14	11	0.157
	Frenillo labial superior con inserción normal, frenillo labial inferior con inserción media	0	3	
	Frenillo labial superior con inserción normal, frenillo labial inferior inserción media	0	1	
	Frenillo labial superior con inserción normal, frenillo labial inferior inserción doble	1	4	
	Datos perdidos			

<i>INSPECCIÓN DE MUCOSA YUGAL Y FONDO DE SACO</i>	Derecho e izquierdo sin alteración	15	19	-
<i>INSPECCIÓN DE LENGUA</i>	Sin alteración Saburral Fisurada Otros Perdidos	7 7 0 0 1	7 6 1 1 4	1.00
<i>INSPECCIÓN DE FRENILLO LINGUAL</i>	Inserción sin alteración	15	19	-
<i>INSPECCIÓN DE PISO DE BOCA</i>	Sin alteración	15	19	-
<i>INSPECCIÓN DE MUCOSA ALVEOLAR Y ENCÍA</i>	Sin alteración Gingivitis Otros Datos perdidos	8 5 1 1	12 3 0 4	0.306
<i>INSPECCIÓN DE PALADAR DURO</i>	Sin alteración	15	19	-
<i>INSPECCIÓN DE AMIGDALAS PALATINAS</i>	Sin alteración Hipertróficas Datos perdidos	13 1 1	15 0 4	0.483
<i>INSPECCIÓN DE UVULA</i>	Sin alteración Inflamada Datos perdidos	13 1 1	15 0 4	0.483
<i>SUCCIÓN DE DEDO</i>	Si No Datos perdidos	2 12 1	3 12 4	1.00
<i>CHUPON</i>	Si No Datos perdidos	3 11 1	5 10 4	0.903
<i>LABIO</i>	Si No Datos perdidos	5 9 1	3 12 4	0.427
<i>MORDEDURA DE LABIO</i>	Si No Datos perdidos	3 11 1	7 8 4	0.153
<i>ONICOFAGIA</i>	Si No Datos perdidos	4 10 1	6 9 4	0.518
<i>BRUXISMO</i>	Si	1	3 12	0.316

	No Datos perdidos	13 1	4	
<i>DEGLUSIÓN ATÍPICA</i>	Si No Datos perdidos	2 12 1	2 13 4	0.941
<i>RESPIRACIÓN BUCAL</i>	Si No Datos perdidos	3 11 1	7 8 4	0.153
<i>RIESGO DE CARIES</i>	Riesgo bajo Riesgo medio Riesgo alto	2 7 5	8 3 4	.071

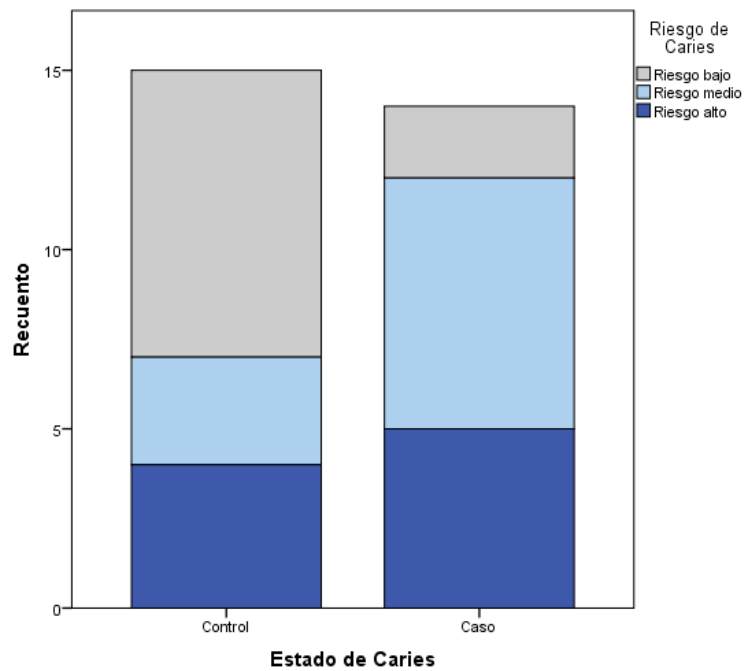


Imagen 7 Gráfico de barras entre el riesgo a caries entre casos y controles

Por último se analizaron los fármacos que se les administró a los casos y controles en las últimas tres semanas antes de la toma de muestra los cuales no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ) en estudios previos se ha observado que ciertos fármacos principalmente los que son indicados en enfermedades como asma, leucemia, antipsicóticos y agonistas colinérgicos directos e indirectos influyen en el flujo salival

(hipersalivación o hiposalivación) y podrían modificar la composición de la saliva e incluso relacionarse con la experiencia a caries (49, 50).

*Tabla 9 Datos sobre medicamentos administrados en las últimas tres semanas antes de la toma de muestra.*

<b>VARIABLE</b>		<b>CASO (15)</b>	<b>CONTROL (19)</b>	<b>VALOR P</b>
<i>GASTROINTESTINALES</i>	Si No	1 14	0 19	0.441
<i>ANTIISTAMÍNICOS</i>	Si No	2 13	0 19	0.187
<i>AINES</i>	Si No	3 12	3 16	1.00
<i>CORTICOSTEROIDES</i>	Si No	2 13	1 18	0.571
<i>ANTAGONISTAS H2</i>	Si No	1 14	0 19	0.441
<i>ANTIBIOTICOS</i>	Si No	3 12	1 18	0.299
<i>ANALGESICOS</i>	Si No	1 14	3 16	0.613

## ANÁLISIS PRIMARIO

Este análisis consiste en verificar las métricas del Phred Quality Score (Q30), densidad de clusters, el porcentaje de alineamiento y el número de lecturas.

Para el Q30 se basó en las guías de Illumina y el kit de secuenciación, los datos alcanzados mostraron que 63.61% de los datos tuvieron un score mayor de 30. Posteriormente la densidad de clúster que se refiere a la densidad de grupos (en miles por mm<sup>2</sup>) detectada por análisis de imágenes, +/- 1 desviación estándar, el resultado obtenido fue de 991 ± 21. Del mismo modo los clusters filtrados con un total de 48,837,888 lecturas, solo 43,965,976 lecturas pasaron el filtro de calidad (lecturas PF). Y por último el porcentaje de alineamiento que se refiere al porcentaje de la muestra que se alinee con el genoma PhiX, que se determinada para cada nivel o lectura independiente, se alcanzó 41%

MÉTRICA	VALOR
<i>Phred Quality Score (Q30)</i>	63.61%
<i>Densidad de clusters</i>	991 ± 21
<i>Porcentaje de alineamiento</i>	41%
<i>Número de lecturas</i>	48,837,888 lecturas
<i>Número de lecturas PF</i>	43,965,976 lecturas

Tabla 10 Valores de las métricas del análisis primario de secuenciación

## ANÁLISIS SECUNDARIO.

El análisis secundario se realizó mediante el software 16S metagenomics rRNA de Illumina, en este programa los archivos input son los FASTQ que se alinearon con la base de datos del proyecto GreenGenes y los archivos output fueron las matrices con las que se realizaron la base de datos para su análisis con SPSS V22.0

## PERFILES BACTERIANOS DE NIÑOS CON Y SIN EXPERIENCIA DE CARIES

Posteriormente se seleccionó el top 10 de especies más representativas para comparar la abundancia relativa del microbiota oral entre casos y controles y así explorar la comunidad microbiana de los individuos con experiencia y sin experiencia de caries. Los resultados revelan que la especie con mayor abundancia en ambos grupos fue *Prevotella melaninogenica* con un 21.72% en el grupo de casos y un 27.60% en controles, posteriormente *Veillonella atypica* con 25.41% para casos y 22.14% para controles, seguido por *Streptococcus tigurinus* con 13.40% para casos y 8.25% para controles. (Imagen 8)

Para este análisis también se realizó un mapa de calor (*heatmap*) basado en el número de lecturas, se puede observar el agrupamiento de las muestras con base en el top 10 de las especies, en donde el color azul agrupa nuestros casos y en el color verde los controles, los tonos azules registran los menores números de lecturas y los tonos rojos los mayores números de lecturas. (Imagen 9).

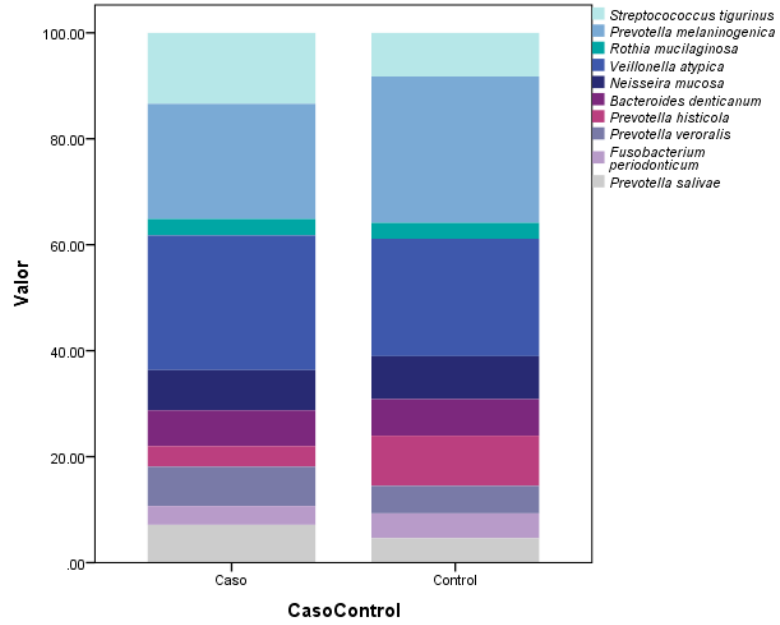


Imagen 8 Abundancia relativa del top 10 de bacterias del microbiota oral en casos y controles

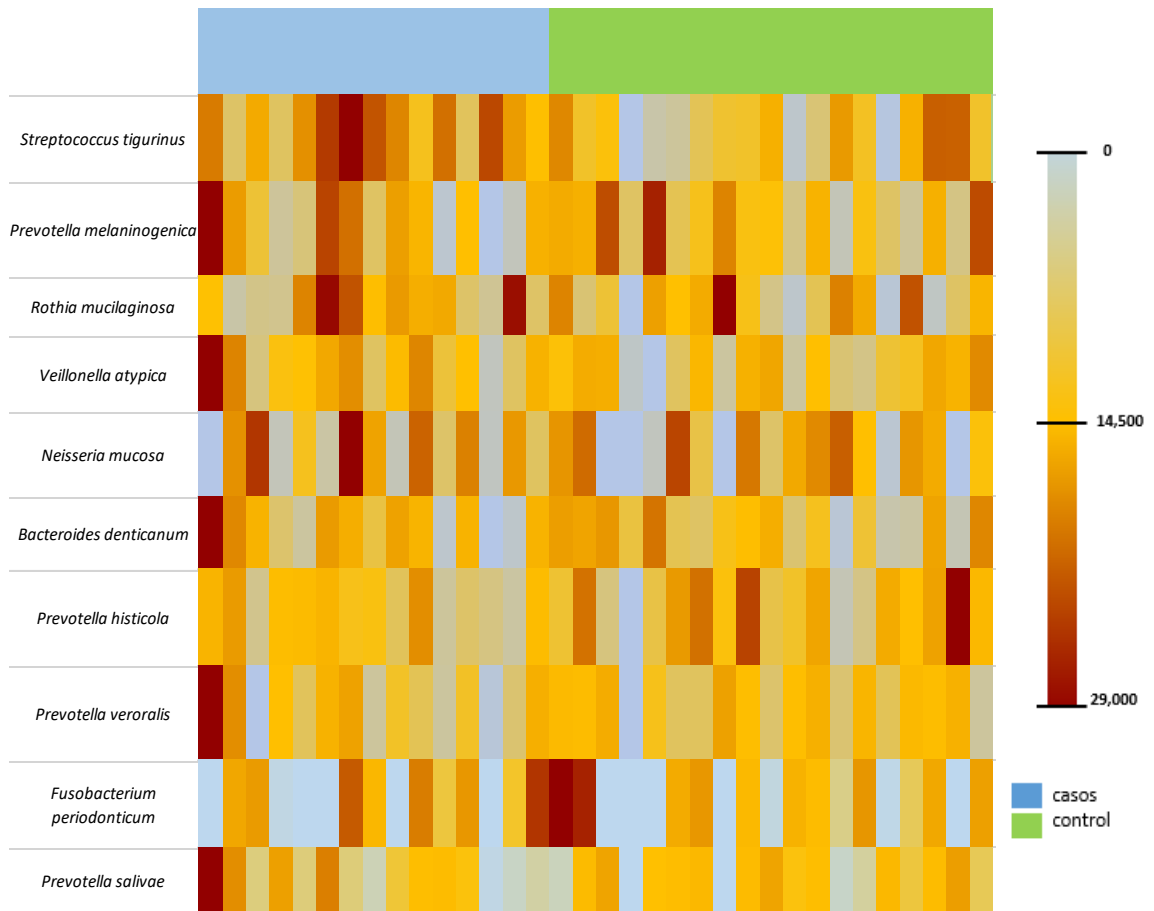


Imagen 9 Mapa de calor del top 10 de especies entre casos y controles

## COMPARACIÓN ENTRE LOS PERFILES BACTERIANOS Y LA EXPERIENCIA DE CARIES.

Continuando con el análisis se realizaron boxplots para observar la distribución de cada especie entre casos y controles (imagen 11), además se obtuvo el valor de p para saber si presentaban diferencias estadísticamente significativas. Las especies que no fueron estadísticamente significativas fueron: *Veillonella atypica*, *Rothia mucilaginosa*, *Prevotella salivae*, *Prevotella histicola*, *Prevotella veroralis*, *Bacteroides denticanum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Neisseira mucucosa* y *Prevotella melaninogenica*. ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, *Streptococcus tigurinus* fue la única especie que tuvo un valor significativo ( $p = 0.010$ ), en el diagrama se observa que se presenta con mayor abundancia en individuos con experiencia a caries que en nuestro grupo control. (Imagen 10)

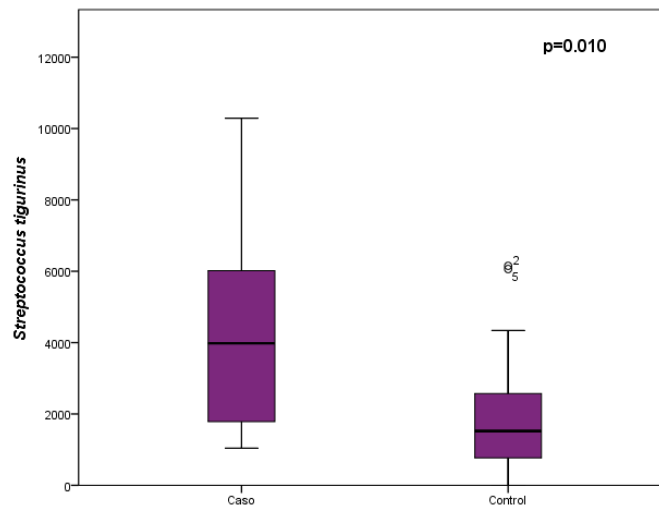


Imagen 10 Bloxplot de *S. tigurinus*



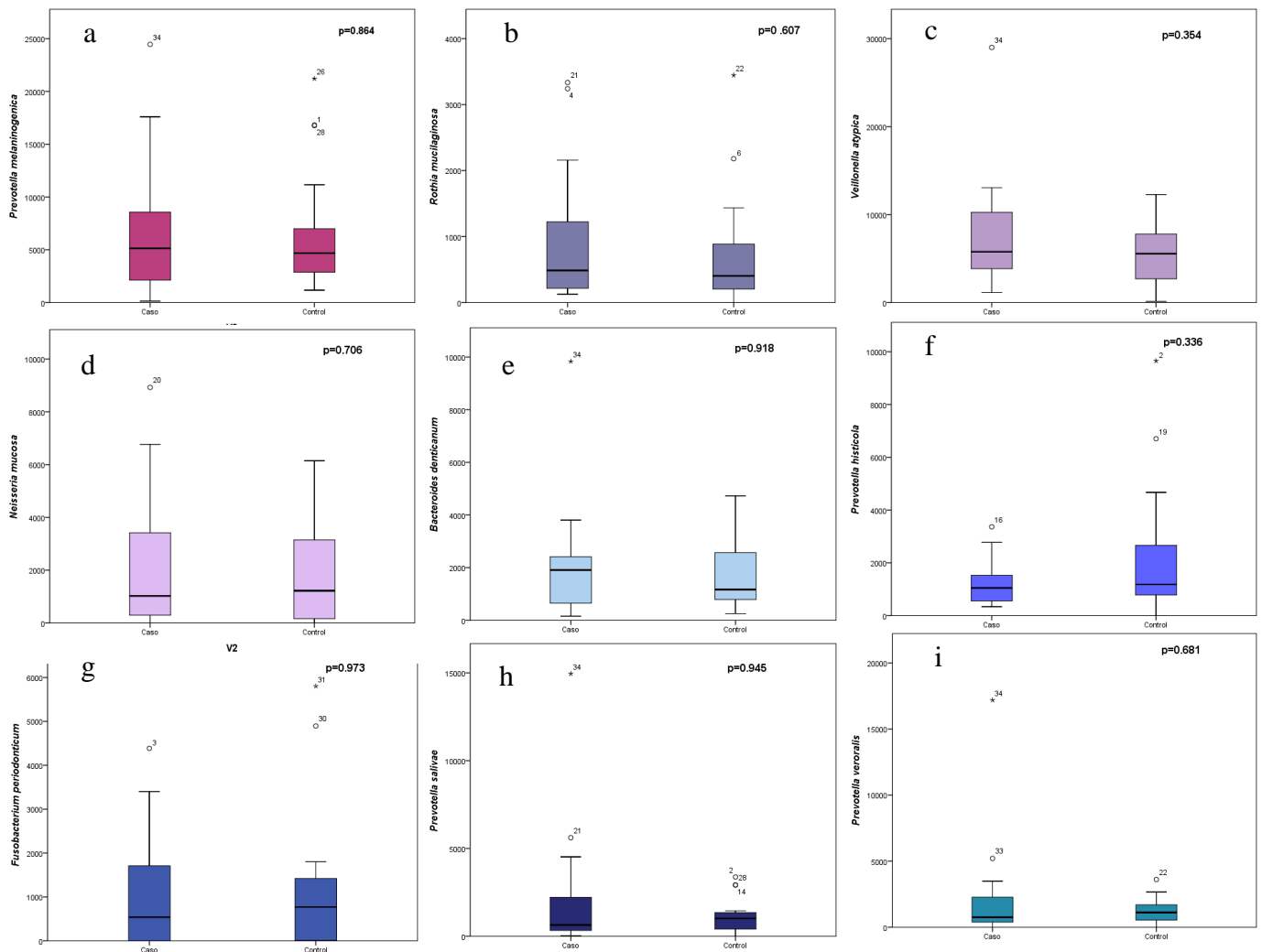


Imagen 11 Boxplots de las especies sin diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). (a) *P. melaninogenica* ( $p=0.864$ ), (b) *R. mucilaginosa* ( $p=0.607$ ), (c) *V. atypica* ( $p=0.354$ ), (d) *N. mucosa* ( $p=0.706$ ), (e) *B. denticanum* ( $p=0.918$ ), (f) *P. histicola* ( $p=0.336$ ), (g) *F. periodonticum* ( $p=0.973$ ), (h) *P. salivae* ( $p=0.945$ ) y (i) *P. veroralis* ( $p=0.681$ )

Se realizó una comparación del microbiota salival entre niños con experiencia y sin experiencia a caries, como ya se mencionó antes muchas de las especies del top 10 no tuvieron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, los que se encontraron aumentados en nuestro grupo de casos y disminuido en los controles fueron: *V. atypica*, *P. melaninogenica*, *S. tigurinus*, *N. mucosa*, *P. veroralis*, *F. periodonticum*, *P. salivae* y *R. mucilaginoso*. Y por el contrario los que se encontraron disminuidos en casos y aumentados en controles solo fueron: *P. histicola* y *B. denticanum* (Tabla 11).

<b>Especie</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<i>Veillonella atypica</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Streptococcus tigurinus</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Neisseira mucosa</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Prevotella veroralis</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Prevotella histicola</i>	Disminuida	Aumentada
<i>Prevotella salivae</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Rothia mucilaginoso</i>	Aumentada	Disminuida
<i>Bacteroides denticanum</i>	Disminuida	Aumentada

Tabla 11 Aumento y disminución del top 10 especies entre casos y controles

## 9. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó la comparación del puntaje obtenido del índice CPOD y los perfiles microbianos de muestras de saliva de 15 niños con experiencia de caries y 19 sin experiencia de caries por medio de la secuenciación del gen ARNr 16S.

Las enfermedades orales más comunes en niños son las maloclusiones, la gingivitis y en primer lugar se encuentra la caries, esta es una enfermedad infecciosa, trasmisible y multifactorial que es causada por bacterias que se adhieren al esmalte y colonizan la superficie dental. En países desarrollados se ha visto un cambio en la morbilidad de esta enfermedad en niños, sin embargo, en países en vías de desarrollo el cambio ha sido lento, en México aún es considerada un problema de salud pública para esta población. Para poder calcular el estado de salud o enfermedad de los individuos necesitamos los índices, en odontología existen múltiples índices, sin embargo, el más utilizado para medir la experiencia de caries en estudios epidemiológicos es el índice CPO/ceo. Este índice tiene muchas ventajas ya que no requiere de equipo especial para poder realizarlo, se necesita menos tiempo para su ejecución, aunque también cuenta con algunas desventajas como es la limitación al evaluar lesiones tempranas. Es por eso por lo que el presente estudio tiene como objetivo poder encontrar una relación entre los puntajes de este índice y los perfiles microbianos de las muestras de saliva obtenidos del análisis metataxonómico.

El análisis se elaboró con el top 10 de especies del microbiota oral entre casos y controles. La especie que se encontró en mayor abundancia fue *Prevotella melaninogenica* con un 21.72% en el grupo de casos y un 27.60% en controles. En estudios previos Qudeimat y cols. encontraron una abundancia significativamente mayor de *P. melaninogenica* en niños con caries que en el grupo control, al igual que el estudio realizado por Nezar y cols. donde esta especie es encontrada con más abundancia en el grupo de niños con experiencia a caries y la relacionan con la biosíntesis de queuosina que está en las vías más comunes asociadas a caries (51).

Posteriormente se encuentra la especie *Veillonella atypica* con 25.41% en casos y 22.14% en controles, no tuvo diferencias significativas. En estudios previos Arif y cols. encontraron esta especie en proporciones similares en niños con caries y sin caries (52). Se ha documentado que las especies de este género se encuentran entre los principales

anaerobios de la cavidad oral y se detectan con frecuencia tanto en lesiones de caries como en microbiota de individuos sanos, estas especies tienen la capacidad de utilizar el lactato para convertir nitrato en nitrito, el nitrito tiene efectos beneficiosos sobre la salud bucal ya que inhibe el crecimiento y el metabolismo de bacterias patógenas orales, como *Streptococcus mutans* (53).

También dentro del top 10 encontramos a *Streptococcus tigurinus* con 13.40% en casos y 8.25% en controles, en esta especie se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.010$ ), en el estudio realizado por Kalpana y cols. son los primeros en encontrar una relación de esta especie en niños con caries, lo clasifican como un potente cariogénico y lo comparan con *S. mutans* por sus propiedades acidúricas y acidogénicas (54). Aunque también se ha relacionado con múltiples infecciones invasivas graves como en el estudio que realizaron Zbiden y cols en donde encuentran esta especie en 14 pacientes con diferentes infecciones graves como: endocarditis infecciosa, bacteremia, meningitis, espondilodiscitis, y empiema. (55)

*Neisseria mucosa* fue otra de las especies que se encontraron dentro del top 10, con 7.57% en casos y 8.10% en controles, en estudios previos Gizani y cols. encuentran esta especie en proporciones parecidas para niños con caries y sin caries, en cambio (56), Sun y cols. mencionan que el género *Neisseria* principalmente la especie *N. elongata* y *N. mucosa* metabolizan productos de bajo pH como ácido láctico en ácidos débiles y ácidos volátiles, y se encuentra en mayor abundancia en individuos libres de caries (57).

Posteriormente se encuentra *Prevotella histicola* con 3.89% para casos y 9.46% controles, no tuvo un valor significativo, Wang y cols. realizan un estudio donde encuentran una abundancia significativamente mayor de esta especie en niños con caries (58). Así mismo se encontró *Prevotella veroralis* con 7.40% para casos y 5.19% para controles, en el estudio realizado por Lee y cols. encuentran mayor abundancia de esta especie en niños con caries (59). Al igual se presentó la especie de *Prevotella salivae* con 7.12% para casos y 4.59% para controles, en el estudio de Jiang y cols. se observa que esta especie estaba aumentada en niños con caries y en los niños sin caries se encontraba disminuida (60). En el estudio realizado por Yang y cols. se describe que diferentes especies de *Prevotella* se presentaban en individuos con y sin caries, entre ellas *P. veroralis*, *P. histicola* y *P. salivae*, sin embargo, no se estableció una relación de estos cambios con la presencia de caries, aunque mencionan un posible vínculo ya que la acidificación del entorno oral pudo provocar el cambio en la composición de este género, ya que estos residentes orales se caracterizan,

por rangos de pH óptimos y una caída repentina del pH podría cambiar su distribución intraoral de forma notable (61).

*Bacteroides denticanum* también se encontró dentro del top 10, con 6.77% en los casos y 6.90% en los controles, el género *Bacteroides* se ha relacionado a la microbiota gastrointestinal, oral y vaginal, al igual se ha relacionado a la resistencia a múltiples antibióticos, a infecciones de origen intra-abdominal y bacteriemias especialmente en niños (62). Sin embargo la especie *B.denticanum* no se ha relacionado con la presencia de caries. *Fusobacterium periodonticum* es otra especie que está en el top 10, con 3.56% en casos y 4.7% en controles, a pesar de que es un patógeno periodontal y se ha asociado a diferentes enfermedades sistémicas, como: Enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, infecciones de vías respiratorias, cáncer (63), también se ha relacionado con caries, en el estudio realizado por Jiang y cols. se detectó con mayor frecuencia en el grupo de niños sin caries que en el grupo con caries(60).

Y por último se presentó *Rothia mucilaginosa* con 3.56% en casos y 4.7% en controles, en estudios previos, Vieira y cols. observaron que esta especie se enriquecía en niños con caries activa y que tiene un papel significativo ya que se ha identificado como un importante iniciador de las interacciones célula-célula de los primeros biofilms que se forman en la superficie dental (64).

No obstante varios estudios han relacionado la presencia de diferentes especies bacterianas con las etapas de caries, se ha podido evidenciar que algunas especies bacterianas predominan solo en etapas iniciales y otras en etapas avanzadas, como se menciona antes el índice CPOD tiene la limitante que no detecta caries en etapas tempranas cuando comienza la desmineralización y se presentan las lesiones o manchas blancas, este índice codifica caries cuando existe una pérdida de estructura o tejido del diente.

En el estudio realizado por Simon-Soro y cols. encuentran que los géneros relacionados a caries de esmalte son *Candida* y algunas especies de *Streptococcus* como *S. mitis* y *S. mutans*. Y los géneros relacionados a caries en dentina están *Prevotella* y *Streptococcus* en los que se presentó un aumento y en las que se vieron disminuidas fueron *Neisseira*, *Fusobacterium* y *Capnocytophaga* (65)

Sin embargo, no podríamos realizar esta comparación con nuestros resultados ya que en nuestro grupo de casos no solo tenemos niños con caries, también se incluyeron todos

aquellos que hayan tenido experiencia de caries, esto quiere decir que de igual forma encontramos niños que no tienen caries, pero ya cuentan con restauraciones.

Conforme a la información revisada, examinando diferentes variables tanto clínicas como sociodemográficas que influyen en los perfiles bacterianos de esta población, encontramos dos limitantes importantes:

1. Algunos de los niños que participaron en este estudio, tenían un diagnóstico de cáncer al momento de tomar la muestra de saliva, esto podría estar modificando los perfiles bacterianos y presentar sesgos en los resultados. Ya que como se mencionó previamente en los antecedentes, las enfermedades a nivel sistémico se ven reflejadas en el microbiota oral.
2. En el diagnóstico clínico ya que a pesar de que nuestro grupo de examinadores tienen experiencia previa realizando el índice (CPOD), no fueron calibrados en conjunto. Cabe mencionar que se inició con el proceso de calibración, sin embargo, se vio frenado por la situación mundial actual (COVID-19).

## 10. CONCLUSIONES

Los estudios de asignación taxonómica por medio del gen ARNr 16S son innovadores para el área odontológica, no solo para caries, también para diferentes enfermedades bucodentales, en los que puede servir como herramienta diagnóstica o pronóstica, identificando bacterias que no pueden ser cultivadas con técnicas convencionales.

Al analizar los perfiles bacterianos de niños con y sin experiencia de caries, encontramos que solo una especie es significativa y en estudios previos se ha relacionado con caries. La relación esperada del índice CPOD con los perfiles del análisis metataxonómico es baja, sin embargo, los resultados son prometedores ya que a pesar de que muchas de las especies no tuvieron un valor estadísticamente significativo, varios de los géneros obtenidos en nuestros resultados se han relacionado con caries en estudios previos.

Las limitaciones que encontramos en este proyecto nos servirán para complementar nuevos estudios, aumentando el número de casos y controles, calibrando en el índice CPOD a nuestro grupo de examinadores y así poder optimizar resultados.

# 11. ANEXOS

## Definición de variables

Variable	Tipo de variable	Definición	Escala de Medición
Edad	Continua	Tiempo de vida a partir del nacimiento.	Número de años cumplidos.
Sexo	Nominal	Características físicas y biológicas que determinan condijo hombre, mujer.	Masculino Femenino
Nacimiento	Nominal	Lugar de nacimiento	Los estados de México u otro país
Residencia	Nominal	Lugar donde está viviendo	Los estados de México u otro país
Hermanos	Nominal	Tiene hermanos	Si No
Número de hermanos	Discreta	Cantidad de hermanos	Número de hermanos.
Embarazo	Nominal	Evolución del embarazo	Normal Alto riesgo Otros
Med Emb	Nominal	Administración de medicamentos durante el embarazo	Si No
Parto	Nominal	Tipo de alumbramiento	Parto eutócico Parto distócico Por cesárea
Neonat	Ordinal	Etapas neonatal	Prematuro A término Post-término
PesoNacer	Continua	Peso al momento del nacimiento	<2.5kg 2.5-3.5kg >3.5kg
Talla	Continua	Talla al momento de nacer	Cm que midió al momento de nacer
Difalnacer	Nominal	Dificultades al momento de nacer	Hipoxia Dificultad de succión Ninguna Otras
AnomalíasCong	Nominal	Presencia de anomalías congénitas	Si No No contesto No sabe
AntFamCan	Nominal	Presencia de cáncer en familiares	Si No
Lugar Cáncer	Nominal	Tipo de cáncer	Descripción de los antecedentes familiares de cáncer (tipo, parentesco, edad)
Exantemicas	Nominal	Antecedentes de exantemáticas	Varicela No
Alergicos	Nominal	Antecedentes alérgicos	Si No No contesto
Neurologicos	Nominal	Antecedentes neurológicos	Si No No contesto
Cardiovascular	Nominal	Antecedentes cardiovasculares	Si No No contesto
Respiratorio	Nominal	Antecedentes respiratorios	Si No No contesto



Variable	Tipo de variable	Definición	Escala de Medición
Gastrointestinal	Nominal	Antecedentes gastrointestinales	Si No No contesto
Musculo esquelético	Nominal	Antecedentes musculo esqueléticos	Si No No contesto
Endocrino	Nominal	Antecedentes endocrinos	Si No No contesto
Dermatológicos	Nominal	Antecedentes dermatológicos	Si No No contesto
Genitourinario	Nominal	Antecedentes genitourinarios	Si No No contesto
Hemolinfatico	Nominal	Antecedentes hemolinfatico	Si No No contesto
Oncológicos	Nominal	Antecedentes oncologicos	Si No No contesto
Tipo de cáncer	Nominal	Tipo de cáncer	Tipo de cáncer que se diagnostico
Psicológicos	Nominal	Antecedentes psicológicos	Si No No contesto
Quirúrgicos	Nominal	Antecedentes quirúrgicos	Si No No contesto
Traumáticos	Nominal	Antecedentes traumáticos	Si No No contesto
Enfermedad	Nominal	Enfermedades que ha presentado	Tipo de enfermedad y edad en la que se diagnostico
Alimentación	Nominal	Tipo de alimentación al nacimiento	Seno materno Biberón Ambos Otros
EdadAlimen	Continua	Tiempo hasta que se alimentó de seno materno o biberón	Número de años en los que se alimentó en las diferentes opciones
Lecheendul	Nominal	Se brindó leche endulzada	Si No No contestó A veces
AlimnNoct	Nominal	Se brindó alimentación nocturna	Si No No contesto
HigieneBucal	Nominal	El paciente lleva a cabo una higiene bucal	Si No No contesto
Quienlorealiza	Nominal	Persona que realiza la higiene bucal del paciente	Padres Paciente Ambos Otros
AuxiliaresHigiene	Nominal	Auxiliares de higiene bucal	Cepillo dental Gasa Pasta Hilo dental Otros
InicioHigiene	Discreta	Frecuencia con que realiza higiene bucal	Una vez al día Dos veces al día Tres veces al día

Variable	Tipo de variable	Definición	Escala de Medición
HigieneNoct	Nominal	Higiene bucal antes de dormir	Si No No contesto
Nivel socioeconomico	Ordinal	Nivel socio económico	A/B C+ C C- D+ D E
Medicamentos	Nominal	Medicamentos que se están suministrando al paciente	Si No No contesto
Tipo	Nominal	Tipo de medicamentos que se están proporcionando al paciente	El nombre del medicamento, dosis y cada cuando se administra
Cáncer	Nominal	Paciente sano o con diagnóstico de cáncer	Caso Control
Diagnóstico 1	Nominal	Primer diagnostico	Control sin cáncer Leucemia Linfoma Sarcoma de tejidos blandos Sarcoma de hueso Tumores se SNC Hepaticos Renales Carcinomas Otras
SitioMetast	Nominal	Lugar donde presenta metástasis	Pulmón Hueso Medula ósea Pulmón y hueso Hígado
LabiosExt	Nominal	Inspección de superficie externa de labios	Alteraciones en labios
LabiosInter	Nominal	Inspección de superficie interna de labios	Alteraciones en labios
FrenilloLab	Nominal	Inspección de frenillo labial	Localización de frenillo
Mucyugfonsac	Nominal	Inspección de mucosa yugal y fondo de saco	Alteraciones en mucosa
Frenillobucal	Nominal	Inspección de frenillo bucal	Localización del frenillo
Lengua	Nominal	Inspección de lengua	sin alteración saburral fisurada pilosa glositis migratoria glositis romboidea media úlceras de Riga-Fede candidiasis otros
Frenilloling	Nominal	frenillo lingual Inspección de	Inserción sin alteración Inserción corta
Pisodeboca	Nominal	Inspección de piso de boca	Sin alteración Ranula Otros
Paladarduro	Nominal	Inspección de paladar duro	Alteraciones en paladar duro
Paladarbland	Nominal	Inspección de paladar blando	Alteraciones en paladar blando
Amigdalaspal	Nominal	Inspección de amígdalas palatinas	Alteraciones en amígdalas
Úvula	Nominal	Inspección de úvula	Sin alteración Bífida Inflamada Ulcerada
Succiondedo	Nominal	Succión de dedo	Si No
Chupón	Nominal	Uso de chupón	

Variable	Tipo de variable	Definición	Escala de Medición
			Si No
Labio	Nominal	Succión de labio	Si No
Mordeduralabio	Nominal	Mordedura de labio	Si No
Onicofagia	Nominal	Presenta onicofagia	Si No
Bruxismo	Nominal	Presenta bruxismo	Si No
Deglatípica	Nominal	Presenta deglución atípica	Si No
Respiraciónbucal	Nominal	Presenta respiración bucal	Si No
Riesgodecaries	Ordinal	Riesgo a tener caries	Riesgo medio Riesgo bajo Riesgo alto
Índice	Discreta	Tiene índice de caries	Si No
Cariado	Discreta	Dientes con caries	Número de dientes con caries
Perdido	Discreta	Dientes perdidos	Número de dientes perdidos
Obturado	Discreta	Dientes con obturaciones	Número de dientes obturados
ÍndiceIndividual	Discreta	Índice individual	Número total de dientes con caries, perdidos y obturados

## 12. REFERENCIAS

1. Silva Flores XD, Ruiz Benavides RC, Cornejo Barrera J, Llanas Rodríguez JD. Prevalencia de caries, gingivitis y maloclusiones en escolares de Ciudad Victoria, Tamaulipas y su relación con el estado nutricional / Prevalence of caries, gingivitis and malocclusions in school-age children in Ciudad Victoria, Tamaulipas, and its relationship with their nutritional status. *Revista odontológica mexicana*. 2013;17(4):221-7.
2. Murrieta Pruneda JF, Juárez López LA, Linares Vieyra C, Zurita Murillo V. Prevalencia de gingivitis en un grupo de escolares y su relación con el grado de higiene oral y el nivel de conocimientos sobre salud bucal demostrado por sus madres. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2004;61(1):44-54.
3. Frecuencia de maloclusiones y su asociación con hábitos perniciosos en una población de niños mexicanos de 6 a 12 años de edad. *Revista ADM*. 2004;61(6):209-14.
4. Fuente Hernández Jdl, Sifuentes Valenzuela MC, Nieto Cruz ME. Promoción y educación para la salud en odontología: Editorial El Manual Moderno; 2014.
5. Sánchez-Pérez L, Martínez LPS, Molina-Frechero N, Irigoyen-Camacho ME, \* PA-M. Riesgo de caries. Diagnóstico y sugerencias de tratamiento In: Martínez LPS, editor. Evaluación del riesgo de caries Sugerencias de diagnóstico y tratamiento México2018.
6. Boj JR, Catalá M, Mendoza A, Planells P, Cortés O. *Odontopediatría : bebés, niños y adolescentes*. Primera edición ed: Odontología Books; 2019.
7. Barbería Leache E. *Atlas de odontología infantil para pediatras y odontólogos*. 2a edición ed: Ripano; 2014.
8. Villalobos-Rodelo JJ, Medina-Solís CE, Molina-Frechero N, Vallejos-Sánchez AA, Pontigo-Loyola AP, Espinoza-Beltrán JL. Caries dental en escolares de 6 a 12 años de edad en Navolato, Sinaloa, México: experiencia, prevalencia, gravedad y necesidades de tratamiento / Dental caries in schoolchildren aged 6-12 years in Navolato, Sinaloa, México: experience, prevalence, severity and treatment needs. *Biomédica*. 2006;26(2):224-33.
9. Reynoso VMG, Morales AGG, Soto CGM, Gurza MER, Quintero EL. Epidemiología de caries dental y factores de riesgo asociados a la dentición primaria en preescolares. (Español). *Epidemiología de la caries dental y factores de riesgo asociados a la dentición primaria en preescolares (Inglés)*. 2009;66(3):10.
10. Higashida Hirose BY. *Odontología preventiva*. 2a ed. ed: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
11. Cuenca Sala E, Baca García P. *Odontología preventiva y comunitaria : principios, métodos y aplicaciones*. 4a edición ed: Elsevier Health Science; 2013.
12. Petersen PE, Báez RJ, Salud. OMDI. *Métodos básicos de las encuestas de salud bucal* Métodos básicos de las encuestas de salud bucal2013.
13. Melgar RA, Pereira JT, Luz PB, Hugo FN, Araujo FBd. Differential Impacts of Caries Classification in Children and Adults: A Comparison of ICDAS and DMF-T. *Brazilian Dental Journal*. 2016;27:761-6.
14. Castro ALS, Vianna MIP, Mendes CMC. Comparison of caries lesion detection methods in epidemiological surveys: CAST, ICDAS and DMF. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):122.
15. Jordan KH, McGwin G, Childers NK. Overestimation of Early Childhood Caries Using the dmfs Index. *Pediatr Dent*. 2020;42(3):208-11.
16. Chojnowska S, Baran T, Wilinska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Knas M. Human saliva as a diagnostic material. *Adv Med Sci*. 2018;63(1):185-91.
17. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci*. 2016;8(3):133-7.

18. Zhang AH, Sun H, Wang XJ. Saliva Metabolomics Opens Door to Biomarker Discovery, Disease Diagnosis, and Treatment. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;168(6):1718-27.
19. Manns Freese A. Sistema estomatognático : fisiología y sus correlaciones clínicas biológicas: Ripano; 2011.
20. Standring S, Borley NR, Gray H. Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. 40th edition, anniversary edition ed: Churchill Livingstone; 2008.
21. Lawrence HP. Marcadores salivales de enfermedad sistémica: diagnóstico no invasivo de enfermedad y seguimiento de la salud general. *Revista de la Asociación Dental Canadiense* 2002.
22. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463-6.
23. Xiaoli G, Shan J, David K, Chin-Ying Stephen H. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000.* 2016(1):128.
24. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints : Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2001;69(3):89-95.
25. Hemadi AS, Huang RJ, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci.* 2017;9:8.
26. Gabriele B, Daria R, Doreen F, Tomislav C, Marie-Christine Champomier V, Trevor C, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.
27. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013;41(2):107-9, 12-8.
28. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research.* 2013;69(1):137-43.
29. Kilian M. The oral microbiome - friend or foe? *Eur J Oral Sci.* 2018;126 Suppl 1:5-12.
30. **M F-G.** Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. In: **Alonso G,** editor. Venezuela2009.
31. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1):51.
32. Bosch JA, Turkenburg M, Nazmi K, Veerman EC, de Geus EJ, Nieuw Amerongen AV. Stress as a determinant of saliva-mediated adherence and coadherence of oral and nonoral microorganisms. *Psychosom Med.* 2003;65(4):604-12.
33. Kato I, Vasquez A, Moyerbrailean G, Land S, Djuric Z, Sun J, et al. Nutritional Correlates of Human Oral Microbiome. *J Am Coll Nutr.* 2017;36(2):88-98.
34. Wu J, Peters BA, Dominianni C, Zhang Y, Pei Z, Yang L, et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *ISME J.* 2016;10(10):2435-46.
35. Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, Owens SM, Handley KM, Scott NM, et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science.* 2014;345(6200):1048-52.
36. Cultrone A, Tap J, Lapaque N, Dore J, Blottiere HM. Metagenomics of the human intestinal tract: from who is there to what is done there. *Curr Opin Food Sci.* 2015;4:64-8.
37. Sudarikov K, Tyakht A, Alexeev D. Methods for The Metagenomic Data Visualization and Analysis. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;24:37-58.
38. Francesco D, Claudia S, Gastone C, Gerardo M, Daniel R, Alessandra De C. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota.
39. Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform.* 2019;20(4):1125-36.
40. Deo P, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral & Maxillofacial Pathology (0973029X).* 2019;23(1):122.

41. Corby PM, Lyons-Weiler J, Paster BJ, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *Journal of clinical microbiology* (Print). 2005(11):5753.
42. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *Journal of clinical microbiology* (Print). 2008(4):1407.
43. Belstrom D, Constancias F, Liu Y, Yang L, Drautz-Moses DI, Schuster SC, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *npj Biofilms Microbomes*. 2017;3:8.
44. Schwendicke F, Dörfer CE, Schlattmann P, Foster Page L, Thomson WM, Paris S. Socioeconomic inequality and caries: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2015;94(1):10-8.
45. Frechero NM, Irigoyen ME, Castañeda EC, Sánchez-Hinojoza G, Bologna RE. Caries dental en escolares de distinto nivel socioeconómico. *Dental decay in schoolchildren of different socioeconomic level*. 2002;69(2):53-60.
46. Guido JA, Martínez Mier EA, Soto A, Eggertsson H, Sanders BJ, Jones JE, et al. Caries prevalence and its association with brushing habits, water availability, and the intake of sugared beverages. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2011;21(6):432-40.
47. Gómez Clavel JF, Peña Castillo RE. La valoración del riesgo asociado a caries.
48. Padilla Suzuki BE, Llodra Calvo JC, Belio reyes IA, García Jau RA, Osuna Ramírez I, Ramírez Alvarez M, et al. Predicción de riesgo de caries en escolares del noroeste de México: estudio longitudinal.
49. Freudenreich O. Drug-induced sialorrhea. *Drugs Today (Barc)*. 2005;41(6):411-8.
50. Shreya D, Sonali S, Abhay Mani T, Piyali B, Kavita D, Deval A. A comparative evaluation of dental caries status and salivary properties of children aged 5–14 years undergoing treatment for acute lymphoblastic leukemia, type I diabetes mellitus, and asthma – In vivo. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. 2018;36(3):283-9.
51. Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *J Dent*. 2021;104:103539.
52. Arif N, Sheehy EC, Do T, Beighton D. Diversity of *Veillonella* spp. from sound and carious sites in children. *J Dent Res*. 2008;87(3):278-82.
53. Wicaksono DP, Washio J, Abiko Y, Domon H, Takahashi N. Nitrite Production from Nitrate and Its Link with Lactate Metabolism in Oral *Veillonella* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(20).
54. Kalpana B, Prabhu P, Bhat AH, Senthilkumar A, Arun RP, Asokan S, et al. Bacterial diversity and functional analysis of severe early childhood caries and recurrence in India. *Sci Rep*. 2020;10(1):21248.
55. Zbinden A, Mueller NJ, Tarr PE, Eich G, Schulthess B, Bahlmann AS, et al. *Streptococcus tigurinus*, a novel member of the *Streptococcus mitis* group, causes invasive infections. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2969-73.
56. Gizani S, Papaioannou W, Haffajee AD, Kavvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(3):193-200.
57. Sun H, Zhao X, Zhou Y, Wang J, Ma R, Ren X, et al. Characterization of Oral Microbiome and Exploration of Potential Biomarkers in Patients with Pancreatic Cancer.
58. Wang Y, Zhang J, Chen X, Jiang W, Wang S, Xu L, et al. Profiling of Oral Microbiota in Early Childhood Caries Using Single-Molecule Real-Time Sequencing.

59. Lee E, Park S, Um S, Kim S, Lee J, Jang J, et al. Microbiome of Saliva and Plaque in Children According to Age and Dental Caries Experience.
60. Jiang S, Gao X, Jin L, Lo EC. Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
61. Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *Isme j.* 2012;6(1):1-10.
62. Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):593-621.
63. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:141-7.
64. Vieira AR, Hiller NL, Powell E, Kim LH, Spirk T, Modesto A, et al. Profiling microorganisms in whole saliva of children with and without dental caries. *Clin Exp Dent Res.* 2019;5(4):438-46.
65. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res.* 2013;47(6):591-600.