



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EXPRESIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y RECEPTORES  
TIPO-TOLL DEL TEJIDO PULPAR DENTAL ASOCIADA A LA  
MICROBIOTA BACTERIANA DE DIENTES CON CARIES MODERADA**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**ANA PAMELA GÓMEZ GARCÍA**

**TUTOR PRINCIPAL:**  
**DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**CIUDAD DE MÉXICO; MÉXICO, A JUNIO DE 2023**



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.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Índice de tablas y figuras .....	3
Glosario .....	4
Agradecimientos .....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción .....	9
Complejo pulpo-dentinario .....	15
Inmunidad del tejido pulpar dental .....	19
Relación de la caries con la inmunidad del tejido pulpar dental.....	19
Odontoblastos .....	22
Células de la inmunidad innata en el tejido pulpar dental .....	25
Receptores tipo-Toll en el tejido pulpar dental.....	27
Citocinas de la inmunidad innata del tejido pulpar dental .....	29
Quimiocinas en el tejido pulpar dental .....	32
Microbioma oral humano.....	34
Variabilidad del microbioma oral .....	35
El factor demográfico en la variabilidad del microbioma oral. ....	35
Microbioma en saliva y placa dentobacteriana entre diferentes poblaciones. ....	37
Microbioma cariogénico entre poblaciones adultas.....	38
Justificación .....	39
Hipótesis .....	41
Objetivos .....	41
Métodos.....	42
Diseño del estudio.....	42
Criterios de selección.....	42
Colección de las muestras .....	43
Extracción de acidos nucleicos a partir de las muestras colectadas.....	45
RT-qPCR a partir del tejido pulpar dental .....	46
Secuenciación por amplicones del gen 16S rRNA a partir de placa dentobacteriana y tejido dentinario .....	48
Análisis estadístico.....	51
Resultados .....	52
Sujetos de estudio .....	52
Microbiota oral asociada a caries moderada de dentina .....	54
Respuesta immune innata del tejido pulpar dental expuesto a caries moderada de dentina .....	62

Correlación entre la microbiota oral cariogénica y los marcadores inflamatorios de la respuesta innata del tejido pulpar dental .....	63
Discusión.....	69
Conclusiones .....	76
Referencias.....	77
Anexo: artículo científico requisito para obtención del grado de Doctor en Ciencias Biomédicas.....	88

## Índice de tablas y figuras

<i>Tabla 1. Zonas histológicas de el tejido pulpar dental.</i> .....	18
<i>Tabla 2. Clasificación de caries según Wyme (Profundidad).</i> .....	20
<i>Tabla 3. Ligandos naturales y sintéticos de TLRs</i> .....	27
<i>Tabla 4. Expresión de TLR en células no inmunes</i> .....	28
<i>Tabla 5. Secuencias de oligonucleotidos</i> .....	48
<i>Tabla 6. Características demográficas de los participantes del estudio</i> .....	53
<i>Tabla 7. Abundancia relativa a nivel de phyla</i> .....	58
<i>Tabla 8. Abundancia relativa a nivel de género</i> .....	60
<i>Figura 1. Zonas histológicas del tejido pulpar dental.</i> .....	17
<i>Figura 2. Clasificación de la caries dental.</i> .....	21
<i>Figura 3. Respuesta inmune innata de los odontoblastos en caries.</i> .....	24
<i>Figura 4. Estructura, localización, especificidad y señalización de los TLRs en mamíferos.</i> .....	29
<i>Figura 5. Modelo de respuesta inflamatoria e inmunológica del tejido pulpar en caries.</i> .....	34
<i>Figura 6. Microbioma oral asociado a caries en adultos.</i> .....	38
<i>Figura 7. Rarefacción de las variantes de secuencia por amplicon (ASV)</i> .....	50
<i>Figura 8. Análisis de beta diversidad de los dos grupos: sin caries y con caries</i> .....	55
<i>Figura 9. El análisis de la alpha diversidad.</i> .....	56
<i>Figura 10. Cladograma representativo por LefSe.</i> .....	53
<i>Figura 11. Abundancia relativa por phyla en la microbiota oral.</i> .....	59
<i>Figura 12 Abundancia relativa por género en la microbiota oral.</i> .....	61
<i>Figura 13. Expresión de receptores tipo Toll (TLR) y marcadores inflamatorios en tejido pulpar dental no expuesto y expuesto a caries</i> .....	62
<i>Figura 14. Matriz de tipo PCA biplot.</i> .....	63
<i>Figura 15. Los datos se visualizan en una matriz de tipo PCA biplot.</i> .....	64
<i>Figura 16. Mapa de redes para asociaciones intermicrobianas e intergénicas.</i> .....	63
<i>Figura 17. Análisis de la correlación entre la microbiota bacteriana cariogénica y la expresión de los marcadores inflamatorios del tejido pulpar dental.</i> .....	67
<i>Figura 18. Resumen gráfico de la asociación de la microbiota bacteriana cariogénica y la respuesta inmune innata del tejido pulpar dental</i> .....	68

# Glosario

## A

Abundancia relativa (AR) .....	7
Ácido Lipoteicoico (LTA) .....	20
Análisis de coordinados principales (PCoA) .....	53, 54, 63
Análisis de discriminación lineal (por sus siglas en inglés Linear Discriminant Analysis [LDA] Effect Size, LEfSe) .....	50
Análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) .....	50

## B

Beta-actina ( $\beta$ Act) .....	46
----------------------------------	----

## C

Células dendríticas (DCs) .....	15
Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) .....	15
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) .....	6
Control no RT sin cDNA (NTC) .....	46

## D

DCs inmaduras (iDCs) .....	22
DNA complementario (cDNA) .....	45
DNA total (tDNA) .....	45

## E

Enfermedad no transmisible (ENT) .....	10
<i>Extended</i> Human Oral Microbiome Database (eHOMD) .....	10

## F

Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- $\beta$ ) .....	22
Factor de crecimiento vascular endotelial (por sus siglas en inglés, VEGF) .....	20
FDR (por sus siglas en inglés, false discovery rate) .....	7, 50
Fibroblastos (Fbs) .....	14

## G

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) .....	46
---	----

## I

Interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ) .....	7
Interleucina 10 (IL10) .....	20
Interleucina 12 (IL12) .....	20
Interleucina 6 (IL6) .....	7

## L

Lipopolisacáridos (LPS) .....	20
-------------------------------	----

## M

Macrófagos (M $\Phi$ s) .....	15
Macrófagos humanos estimulados con lipopolisacárido (hM $\Phi$ /LPS) .....	46

Matriz de metaloproteinasas (MMP) .....	22
Microbioma oral humano (por sus siglas en ingles HOM).....	10

## N

Neutrófilos polimorfonucleares (PMN) .....	24
--	----

## O

Odontoblastos (Obs).....	14
Organización Mundial de la Salud (OMS) .....	10, 38

## Q

Quimiocina C-X-C motivo ligando quimiocina 8 (CXCL8, también llamada IL8) .....	20
Quimiocina CXCL8 .....	40, 62, 67, 68, 76

## R

<i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)</i> .....	46
Receptor tipo-Toll 2 (TLR2) .....	46
Receptor tipo-Toll 4 (TLR4) .....	46
Receptores tipo-Toll (TLR).....	7
Respuesta inmune innata (RII).....	7
Retículo endoplásmico rugoso (RER) .....	21
<i>Retrotranscripción (RT)</i> .....	45
RNA mensajero (mRNA).....	45
RNA total (tRNA) .....	44

## S

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB).....	10, 38
--	--------

## T

Tejido dentinario (TD).....	7, 44
Tejido pulpar dental (TPD).....	7, 10

## U

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) .....	6, 41
--	-------

## V

Variantes de secuencia de amplicones (ASV) .....	48
--	----

## B

$\beta$ -defensina 1 ( $\beta$ D-1) .....	21
$\beta$ -defensina 2 ( $\beta$ D-2) .....	21

## Agradecimientos

A los proyectos DGAPA-PAPIIT [IN218619 e IN212422] por el financiamiento para la realización de este proyecto de tesis; al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca número 583718.

Al personal académico Sinodal para el examen de grado: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, Dr. Gonzalo Castillo Rojas, Dr. José Luis Maravillas Montero y Dr. Issac González Santoyo por las valiosas aportaciones durante la revisión del manuscrito.

A la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal por la asesoría técnica para la purificación de ácidos nucleicos, el diseño experimental de ensayos de RT-qPCR. Dra. Patricia Orduña Estrada del Laboratorio de Microbioma y Programa de Inmunología Molecular microbiana del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Agradecemos a la Dra. Rosa María Wong Chew de la División de Investigación y a los técnicos académicos Antonio Humberto Ángel Ambrosio, Miguel Leonardo García León y Patricia Bautista Carbajal del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las facilidades puestas a disposición para llevar a cabo el análisis de calidad del RNA por electroforesis capilar, el aislamiento y purificación del DNA, y RT-qPCR. A los técnicos académicos Dra. Alma Reyna Escalona Montaña, Biol. Ofelia Pérez Olvera, MVZ Daniel Andrés Sánchez Almaraz de la Unidad de Investigación UNAM-INC, División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM. A la MS Miriam E. Nieves Ramírez, QFB Catalina Gayosso Vázquez y Dra. Norma Salaiza Suazo de la Unidad de Investigación de Medicina Experimental, en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" en la Ciudad de México. Dr. Jesús Argueta Donohue del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente por su asesoría en estadística. Profesor Valentín Nieves Hoshiko del Programa de Cirugía Maxilofacial de Cirugía Oral y Maxilofacial, el profesor Esp. Samuel Jiménez Escamilla de Clínica de Cirugía Maxilofacial del Programa de Licenciatura de la Facultad de Odontología, UNAM, y la Mtra. Paulina Hernández Ruíz por su colaboración en la donación de los dientes sanos y aquellos con caries utilizadas en este estudio.

## Resumen

La prevalencia de caries dental en la población adulta mexicana de 20 a 85 años es de alrededor de 93.3% y de 50% en niños y adolescentes mexicanos. En todo el mundo, es la enfermedad no transmisible más común. Uno de los principales factores etiológicos para la caries dental es el microbioma oral y los cambios en su estructura y función, con una expansión de bacterias patógenas como *Streptococcus mutans*. El tejido pulpar dental (TPD) expuesto desencadena una respuesta inmune innata (RII) para contrarrestar esta invasión bacteriana. La relación entre la disbiosis oral y las respuestas inmunes innatas sigue sin estar clara. Nuestro objetivo fue determinar la relación entre la RII y la microbiota bacteriana (MB) oral cuantificando la expresión de receptores tipo-Toll (TLR) y marcadores inflamatorios (citocinas y una quimiocina) en el TPD, ya sea expuesto o no al tejido dentinario (TD) cariado, y correlacionar esta información con el microbioma oral que se encuentra en los dientes sanos y aquellos con caries moderada. El ARN se purificó a partir de tejido pulpar, se sometió a RT-qPCR y se analizó con el método doble delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). La placa dental supragingival de dientes no cariados y el TD de dientes cariados se sometieron a secuenciación dirigida 16S. Se utilizaron el análisis de coordenadas principales (PCoA), el ANOVA multivariado permutacional y el análisis discriminante lineal (LefSe) para evaluar las diferencias entre los dientes sin caries y los cariados. El análisis de correlación se llevó a cabo con la prueba de *Spearman* con corrección de comparaciones múltiples por el método FDR (por sus siglas en inglés, false discovery rate). La abundancia relativa (AR) de *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Prevotella* spp. y *Mitsuokella* spp. aumentó en los dientes cariados; mientras que la AR de *Haemophilus* spp. y *Porphyromonas* spp. disminuyó. *Olsenella* spp. y *Parascardovia* spp. solo se detectaron en dientes cariados. Se detectó una sobreexpresión significativa de interleucina 1 beta (IL1  $\beta$ ), interleucina 6 (IL6) y quimiocina (CXCL8) en el TDP expuesto a caries moderada de dentinaria. IL1 $\beta$  se correlacionó positivamente con TLR2 y *Actinomyces* spp.; pero

negativamente con *Porphyromonas* spp. Los hallazgos de este estudio muestran que, en la caries moderada de dentina, el microbioma cariogénico induce una respuesta inmune en el TPD, caracterizada por la expresión de las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$  e IL6 y la quimiocina CXCL8. La expresión de estas citocinas podría estar guiada a través de la vía de los TLRs; particularmente TLR2.

## Abstract

The prevalence of dental caries in the Mexican adult population 20 to 85 years old is around 93.3%, and 50% in Mexican children and adolescents. Worldwide, it is the most common non-communicable disease. One of the main etiological factors for dental caries is the oral microbiome and changes in its structure and function, with an expansion of pathogenic bacteria like *Streptococcus mutans*. The exposed dental pulp tissue (DPT) triggers an innate immune response to counteract this bacterial invasion. The relation between oral dysbiosis and innate immune response (IIR) remains unclear. We aimed to understand the relationship between innate immune response and the oral microbiota by quantifying the expression of Toll-like receptors (TLRs) and proinflammatory markers (cytokines and a chemokine) in dental pulp tissue, either exposed or not to carious dentin, and to correlate this information with the oral microbiome found in healthy teeth and those with moderate caries. RNA was purified from pulp tissue, subjected to RT-qPCR and analyzed with the  $\Delta\Delta C_t$  method. Supragingival dental plaque of non-carious teeth and dentin of carious teeth were subjected to 16S targeted sequencing. Principal coordinate analysis, permutational multivariate ANOVA, and linear discriminant analysis were used to assess differences between non-carious and carious teeth. Correlations were assessed with Spearman's test and corrected for multiple comparisons using the false discovery rate (FDR) method. The relative abundance (RA) of *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Prevotella* spp., and *Mitsuokella* spp. was increased in carious teeth; while the RA of *Haemophilus* spp. and *Porphyromonas* spp. decreased. *Olsenella* spp. and *Parascardovia* spp. were only detected in carious teeth. Significant overexpression of interleukin 1 beta (IL1  $\beta$ ), IL6, and CXCL8 was detected in pulp tissue exposed to carious dentin. IL1 $\beta$  correlated positively with TLR2 and *Actinomyces*; yet negatively with *Porphyromonas* spp. The findings show that the cariogenic microbiome induces an immune response in DPT, characterized by the expression of the proinflammatory cytokines IL1 $\beta$  and

IL6, and chemokine CXCL8. The expression of these cytokines could be driven through the TLR pathway, particularly TLR2.

## Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 3.580 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por enfermedades bucodentales. La enfermedad no transmisible (ENT) más prevalente en todo el mundo es la caries dental, seguida de la enfermedad periodontal [1]. En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles (SIVEPAB, 2020) reportó que la caries afecta al 93.3% de la población de entre 20 y 85 años; y alrededor del 50% de la población infantil y adolescente [2]. Cuando esta enfermedad (la caries dental) no se trata, puede provocar daño al tejido pulpar dental (TPD), así como abscesos dentales, periodontitis apical y finalmente, la pérdida de los dientes. Por lo tanto, esta enfermedad es un importante problema de salud pública [3]. Teniendo en cuenta que la etiología de la caries dental es multifactorial [4], el desequilibrio en el microbioma oral, a menudo denominado disbiosis, se han considerado como uno de los principales factores etiológicos en el desarrollo de enfermedades orales [4].

La disbiosis se puede describir como una alteración compositiva y funcional en la microbiota en individuos con enfermedad comparada con sujetos sanos [5]. Las variaciones naturales en la microbiota pueden deteriorarse a un estado de disbiosis [6], [7] cuando las condiciones de estrés disminuyen rápidamente los microorganismos beneficiosos (comensales), promueven una expansión de microbios potencialmente dañinos (patobiontes) asociados a enfermedad y/o inducen una pérdida de diversidad microbiana general [8], [9]. Los mecanismos subyacentes a la disbiosis a menudo no están claros, dado que las combinaciones de variaciones naturales y factores de estrés pueden estar modulando diversos eventos desestabilizadores [10].

El microbioma oral humano (por sus siglas en inglés HOM) consiste en un colectivo bien organizado de microorganismos (incluyendo bacterias, virus, hongos, parásitos y archaeae; en conjunto con sus genes y metabolitos) [11], de los cuales la gran mayoría son comensales

[11]–[15]. Sin embargo, ya que la disbiosis del microbioma oral está vinculada a enfermedades sistémicas, la salud bucodental ha estado a la vanguardia de la investigación y la terapéutica de intervención [16]. La *extended* Human Oral Microbiome Database (eHOMD, abril de 2022) enumera 774 especies bacterianas en la cavidad oral, divididas en diferentes filos como *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Synergistetes* y *Proteobacteria* [17]. *Streptococcus viridians* (anteriormente conocido como *S. mitis*) es la especie bacteriana predominante en la cavidad oral humana, que se encuentra en la saliva y la placa dental (entre otros nichos). *S. oralis* es la especie colonizadora inicial de la superficie dental y puede regular los primeros eventos en la formación de la placa dentobacteriana (PDB) [18]. La patogénesis de la caries se asocia con la disbiosis oral, particularmente con la prevalencia de bacterias conocidas colectivamente como microbiota bacteriana (MB) cariogénica como *S. mutans* [19]–[22].

En los últimos años, los estudios moleculares han demostrado que los géneros como *Lactobacilli*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Cutibacterium* (anteriormente *Propionibacterium*) y *Atopobium* podrían desempeñar un papel importante en la patología de la caries dental, actuando sinérgica o antagónicamente contra *Streptococcus mutans* [23]–[25]. Varios autores han reportado la compleja diversidad bacteriana de la caries en adultos de diferentes poblaciones: Munson et al. [26] tomaron muestras a nivel medio y profundo del tejido dentinario cariado de sujetos ingleses. Sus hallazgos revelaron la presencia de determinadas especies bacterianas; predominantemente *S. mutans* (16%), *Lactobacillus gasseri/johnsonii* (13%), *L. rhamnosus* (8%), *Rothia dentocariosa* y *Propionibacterium spp.* Por otra parte, Chhour et al. [27] describieron la carga bacteriana en lesiones avanzadas de caries de sujetos australianos. Los autores reportaron que *Lactobacillus spp.* comprendían el 50% de las especies, mientras que *Prevotellae* comprendían el 15%. Otros taxones con gran abundancia fueron *Selenomonas spp.*, *Dialister spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium*

spp., miembros de la familia *Lachnospiraceae*, *Olsenella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp. y *Pseudoramibacter alactolyticus*. *S. mutans* no fue detectado en este estudio. Otro grupo de investigación, analizó el tejido dentinario cariado y placa dentobacteriana libre de caries de pacientes alemanes. Sus hallazgos revelaron un incremento significativo de *Propionibacterium acidifaciens*, siendo este último aproximadamente 40 veces más abundante que *S. mutans* [25]. Hoy en día, los investigadores están ampliamente de acuerdo en que *S. mutans* sirve como un buen marcador para la caries dental, pero no necesariamente como el único y exclusivo agente etiológico [28]. Estos hallazgos coinciden con estudios anteriores, demostrando que existe un microbioma distintivo de la cavidad oral sana y que es diferente del asociado con la caries [29]. Sin embargo, los hallazgos de la composición del microbioma oral en la caries moderada, una etapa caracterizada por la descomposición del esmalte y sin signos visuales de exposición del TD son poco reportados.

Con el tiempo, la caries dental conduce a una enfermedad irreversible por desmineralización de los tejidos duros dentales, y posteriormente la destrucción de la sustancia orgánica del diente, lo que resulta en una caries progresiva que conduce a la formación de una cavidad [30]. A medida que continúa la desmineralización del esmalte, el TD está expuesto a la invasión bacteriana, lo que resulta en una mayor desmineralización y cavitación [31]. Lamentablemente, no hay síntomas o signos visuales en las etapas iniciales de la caries. Los síntomas comienzan cuando las lesiones cariosas crecen y progresan a TD [32]. Si la caries permanece sin tratamiento, progresa a una caries profunda que penetra en todo el espesor del TD con una exposición del TPD específica. En esta etapa, se produce una respuesta inflamatoria con isquemia y dolor severo en el TPD. [33]

Diferentes estudios, *in vitro* e *in vivo*, en modelos murinos y líneas celulares pulpares han mostrado que cuando el plexo neuronal [34] y las células del complejo pulpo-dentinario [35]–

[37] están expuestos a las etapas moderada y avanzada de la caries dental, responden directamente a los componentes bacterianos de una MB cariogénica grampositiva y gramnegativa produciendo varias quimiocinas [38], [39], así como citocinas reguladoras y proinflamatorias [40]; a través de la expresión de receptores tipo Toll (TLRs) [35]–[37] para promover los procesos de defensa celular e intentar detener y reparar el daño al TPD [41], [42]. Estos hallazgos indican que la RII del complejo pulpo-dentinario inducida por determinados perfiles bacterianos podría resultar, en parte, de la activación directa de receptores de superficie celular a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), como el ALT y LPS, y a su vez estar participando en el tipo de sintomatología pulpar [43]–[45].

Sin embargo, los pasos iniciales son difíciles de definir porque la caries dental generalmente se caracteriza por una progresión lenta, que tiene lugar en dirección vertical desde la superficie del diente hasta el TPD. Dado que el TPD está expuesto a una gran cantidad de componentes antigénicos, cuando una lesión cariosa se aproxima por lo menos a 2 mm del TPD [46], éste puede progresar a una respuesta inflamatoria clínicamente irreversible [47]. Donde en casos severos, la abundancia de componentes antigénicos típicamente causa infecciones del TPD que pueden inducir necrosis pulpar y periodontitis apical caracterizados por la destrucción del hueso periodontal [3], [48], [49]. En consecuencia, los microorganismos orales pueden trasladarse a otros órganos [50]–[54].

Por lo tanto, numerosos estudios han reportado cambios en la comunidad microbiana y respuesta inmune del TPD en presencia de la caries [19], [37], [40], [55]. Sin embargo, estos estudios no han abordado el eje microbiota-inflamación pulpar, de manera conjunta, en modelos *in vivo* de caries moderada. Lo anterior es relevante para comprender cómo el TPD humano responde de forma *in situ* a la MB cariogénica en condiciones naturales de una etapa de la enfermedad donde el tejido puede clínicamente responder, o no, de manera favorable. Por

tal motivo, los objetivos de este estudio se enfocaron en caracterizar el microbioma oral asociado a la presencia y usencia de caries en dientes permanentes en adultos y cuantificar la expresión de receptores tipo-Toll 2 y 4 y marcadores inflamatorios en el TPD, así como explorar las relaciones entre la MB oral y los marcadores asociados con la RII del TPD expuesto a caries moderada.

## **Antecedentes**

### ***Complejo pulpo-dentinario***

#### *Tejido dentinario (llamado dentina)*

El TD es un tejido conectivo especializado avascular, duro, elástico, blanco amarillento que forma la masa dental que soporta al esmalte compensando su fragilidad y que encierra a la cámara pulpar central. Se puede clasificar de diferentes maneras en base a su localización, patrón de mineralización y desarrollo. Aproximadamente el 70% de su peso está mineralizado por cristales de hidroxiapatita. El principal componente orgánico es colágeno tipo IV. Una característica del TD es los túbulos dentinarios estrechamente empaquetados los unos con los otros, que atraviesan todo su espesor y que contienen las prolongaciones citoplasmáticas de las células que una vez la formaron y que posteriormente la mantienen. Estas células son los odontoblastos (Obs), sus cuerpos celulares están alineados en la superficie interna del TD, donde forman el límite periférico de la pulpa dentaria. La existencia de los Obs hace que la dentina sea un tejido muy diferente al esmalte. La dentina no es solamente un tejido sensible, sino que lo más importante es que es capaz de repararse dado que se pueden estimular los Obs para que depositen más dentina según lo requiera la ocasión [56].

### *Tejido pulpar dental (pulpa dental)*

El TPD es un tejido conjuntivo único situado y encapsulado por la dentina mineralizada. Como tejido conjuntivo, el mayor constituyente es la matriz extracelular formada por dos componentes principales: el primer componente son las proteínas fibrilares, entre ellas la elastina que le confiere elasticidad al tejido y el colágeno que le confiere fuerza; el segundo componente es la sustancia fundamental, la cual es responsable de las funciones de viscoelasticidad y filtración del tejido conectivo. Los fibroblastos (Fbs) son la principal célula del tejido conjuntivo. Éstos forman una red con la matriz extracelular y producen un amplio número de componentes de la matriz. Igualmente, son responsables de la degradación de los elementos extracelulares por lo que son esenciales en la remodelación del tejido conectivo [57].

### *Organización estructural del tejido pulpar dental*

La superficie externa de la pulpa está delimitada inicialmente por la capa odontoblástica constituida por Obs [58] Éstos forman una única capa en la periferia de la pulpa, con cuerpos celulares en la pulpa y prolongaciones citoplasmáticas que se extienden en los túbulos dentinarios [57], [58]. La forma del cuerpo de los Obs, varía de acuerdo a la localización: en la zona coronaria, son altos y columnares; en la porción media, son cortos y columnares y en la porción radicular son cuboidales y planos. En esta capa se encuentra una gran cantidad de capilares llamada red capilar terminal, al igual que fibras nerviosas entrelazadas en ramos llamadas plexo de Raschkow, los cuales pasan entre los Obs [58].

Así mismo, se encuentra una gran cantidad de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) Clase II expresadas en las células dendríticas (DCs) que son responsables de detectar los estímulos antigénicos transdentales [57], [59]. Subyacente a la capa odontoblástica se encuentra la zona libre de células conocida como Zona de Weil, constituida principalmente por fibras nerviosas amielínicas, capilares sanguíneos y Fbs. Más profundamente está situada la zona rica en células que tiene una alta densidad de Fbs, células

mesenquimatosas indiferenciadas, células de defensa como macrófagos (Mφs) y linfocitos, capilares sanguíneos y nervios (Tabla 1 y figura 1) [58]

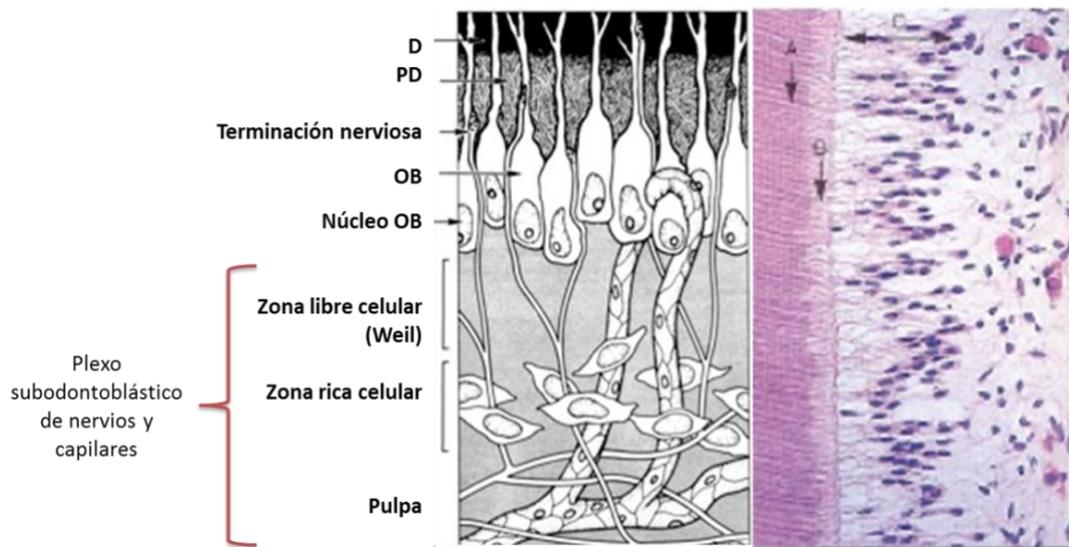


Figura 1. Zonas histológicas del tejido pulpar dental.

Izq. Organización estructural de la pulpa (Pashlye). Der. Complejo dentino-pulpar; A) dentina mineralizada, B) predentina y C) OBs, odontoblastos. (Stock). D: dentina; PD; pulpa dental. Ingle's Endodontics [58].

Tabla 1. Zonas histológicas del complejo pulpo-dentinario y sus componentes celulares.

<b>Capa odontoblástica</b>	Obs, capilares, fibras nerviosas, DCs.
<b>Zona libre celular de weil</b>	Plexo de Raschkow (red rica en fibras nerviosas amielinicas), capilares, procesos Fbs.
<b>Zona rica celular</b>	Alta densidad de Fbs, células mesenquimales indiferenciadas.
<b>Pulpa propiamente dicha</b>	Vasos sanguíneos, fibras nerviosas, Fbs, mesenquimales indiferenciadas, inmunocompetentes (DCs, Mφs, Linf.), fibras y sustancia fundamental.

Abreviaturas: *Obs*: odontoblastos; *DCs*: células dendríticas; *Fbs*: fibroblastos; *Mφs*: macrófagos; *Linf*: linfocitos. Ingles´s Endodontics [58].

El TPD se considera, junto con la dentina, como un complejo conocido como complejo pulpo-dentinario, dada su relación anatómica, de desarrollo y de función. Los procesos odontoblásticos y las terminaciones nerviosas se extienden en la dentina. La funcionalidad de ambas se ejemplifica en los siguientes aspectos: a) la pulpa es capaz de elaborar dentina tanto fisiológicamente como en respuesta a un estímulo externo, b) la pulpa contiene nervios que le dan la sensibilidad a la dentina, c) el tejido conjuntivo pulpar es capaz de responder a lesiones dentinarias aun cuando no es directamente estimulada, d) la dentina que rodea la pulpa crea un ambiente de baja capacidad de expansión que limita el potencial de defensa de la pulpa [57], [59]. La capacidad del tejido conectivo para generar y soportar la inflamación local y la respuesta inmune, lo hacen un participante activo en la defensa del hospedero. Una considerable parte de esta capacidad depende de las células inmunocompetentes que se encuentran en el tejido pulpar. Estas células son reclutadas de la sangre, donde residen como habitantes transitorios. Una vez que los antígenos extraños ganan acceso al tejido conectivo, estas células interactúan para ejecutar mecanismos que ayudan a defender al tejido de la invasión infecciosa [57], [59].

### ***Inmunidad del tejido pulpar dental***

Las células inmunocompetentes residentes en el tejido conectivo pulpar pueden responder a distintas condiciones clínicas que causan pérdida de la integridad de los tejidos duros del diente como la caries, fracturas y preparaciones cavitarias. Las bacterias y sus productos provenientes de la cavidad bucal son elementos importantes asociados con tal respuesta. Es importante destacar que la respuesta pulpar puede iniciarse aun cuando la pulpa no esté directamente expuesta a la cavidad bucal. Algunos estudios han revelado que las células que expresan moléculas clase II del MHC responden pronta y activamente a la lesión dentinaria, preferiblemente por medio de la detección de antígenos; posteriormente se inicia la respuesta inmune actuando como células presentadoras de antígeno [42], [60]. Las células que poseen moléculas clase II del MHC, están compuestas en su mayoría son DCs y Mφs. La respuesta pulpar inicial se caracteriza por la acumulación localizada de DCs debajo de las terminaciones pulpares de los túbulos dentinarios en comunicación con las lesiones cariosas. La acumulación a este nivel, indica que estas células responden rápidamente a los Ags bacterianos que se difunden a través de los túbulos dentinarios [61], [62]. Sin embargo, hay evidencia de la formación de dentina reparadora después de la acumulación de DCs, lo que sugiere una menor presencia de Ags bacterianos. Sin embargo, estas células rápidamente se acumulan cuando la dentina reparadora es invadida por caries, estos hallazgos apoyan la idea propuesta de que la intensidad de la respuesta inmunoinflamatoria debajo de la caries dentaria no necesariamente corresponde a la profundidad de la lesión, sino que puede estar asociada con el estado y la calidad del proceso reparativo del TD y su influencia en la permeabilidad dentaria [61], [62].

### ***Relación de la caries con la inmunidad del tejido pulpar dental***

La caries es una enfermedad del tejido conjuntivo duro, infecciosa multifactorial de origen quimicobiológico caracterizada por la destrucción de los tejidos duros del diente como

consecuencia de una desmineralización provocada por los ácidos que generan los microorganismos de la PDB a partir de los carbohidratos de la dieta [58]. A lo largo de los años la caries se ha clasificado de diferentes maneras en base a los tejidos anatómicos dentales que invade, su localización en las superficies dentales, su evolución clínica, su profundidad, entre otras más. Una de las clasificaciones más conocidas y usadas es la clasificación de Wyme basada en la profundidad de la caries y los tejidos que afecta (Tabla 2 y figura 2) [63].

Tabla 2. Clasificación de caries según Wyme (Profundidad).

<b>Primer Grado</b>	Esmalte Asintomática
<b>Segundo grado</b>	Extensa y poco profunda Esmalte y dentina Asintomática/Sintomática (dolor provocado) Avanza con mayor rapidez Se puede diferenciar en zonas: De reblandecimiento o necrótico. De invasión o destructiva. De defensa o esclerótica.
<b>Tercer grado</b>	Involucra pulpa dental Sintomática (dolor provocado y/o espontaneo)
<b>Cuarto grado</b>	Pulpa parcialmente vital Pulpa destruida en su totalidad Asintomática (Necrosis)
<b>Quinto grado</b>	Puede haber manifestaciones periodontales Cemento (Raíz)

Tomado y modificado de Vargas Soler [63]

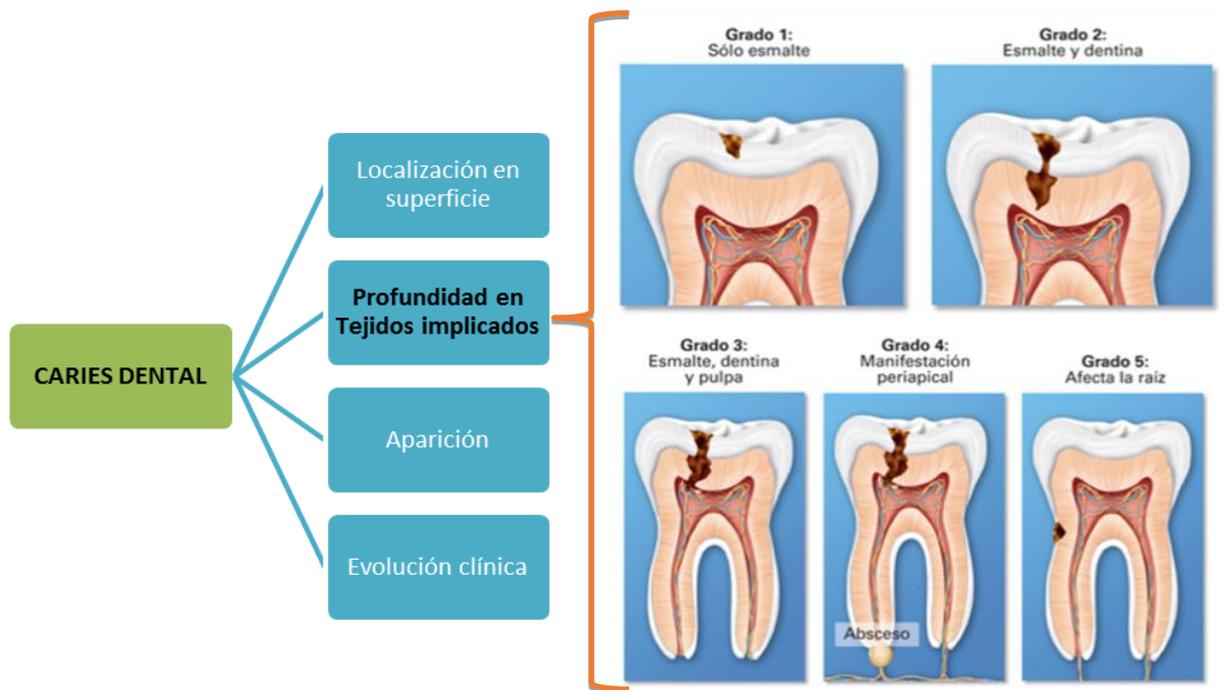


Figura 2. Clasificación de la caries dental.

Grado 1: solo esmalte. Grado 2: esmalte y dentina. Grado 3: esmalte, dentina y tejido pulpar dental. Grado 4: caries profunda, invasión del esmalte, dentina y espacio del conducto radicular, con necrosis pulpar y manifestación periapical. Grado 5: a nivel de la porción radicular del diente. [63]

Se ha demostrado a través de diversos estudios, que el TPD tiene varios mecanismos de defensa contra la caries. Así mismo, se ha observado un aumento en el cúmulo de células inmunocompetentes en los tejidos pulpares debajo del TD reparador [64]. La MB cariogénica es compleja y varía entre lesiones individuales. Su composición depende de la dieta, saliva y la cronicidad de la lesión. Para el inicio y progresión de la caries los microorganismos más importantes son del grupo de los Estreptococos como: el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus* y el grupo de *Lactobacillus*. A medida que la lesión progresa hacia la dentina, hay una transición de bacterias, predominantemente facultativas y grampositivas, las cuales se encuentran en caries superficiales, cambiando a *Lactobacilos* y bacterias anaerobias en mayor proporción en caries profundas. Esta transición se debe a cambios en el ecosistema, oxígeno y nutrientes. Cuando la caries invade el TPD, la inflamación se manifiesta con dolor

e hipersensibilidad, debido a los productos metabólicos de las bacterias y los componentes de la pared celular como el ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias grampositivas y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas. El LTA, es una molécula anfifílica, liberada extracelularmente por las bacterias grampositivas acidogénicas, que se difunden hacia la pulpa a través de los túbulos dentinarios y provocan respuestas inmunes, así como los LPS de las bacterias gramnegativas. Ambos, activan el sistema inmune innato por medio de mecanismos similares. Estas moléculas se unen a receptores de superficie celular como los receptores tipo-Toll (por sus siglas en inglés, TLRs) que activan las señales que inducen la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alpha ( $TNF\alpha$ ), interleucina 1 beta ( $IL1\beta$ ), la quimiocina C-X-C motivo ligando quimiocina 8 (CXCL8, también llamada IL8), la interleucina 12 (IL12), y las citocinas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL10) [64]. Aunque el LTA es mucho menos potente que el LPS para inducir la liberación de citocinas proinflamatorias en M $\phi$ s, posee una capacidad similar en cuanto a la inducción de M $\phi$ s para la liberación del factor de crecimiento vascular endotelial (por sus siglas en inglés, VEGF). Un rápido incremento de éste, puede resultar en un aumento agudo de la presión tisular intersticial en un espacio pulpar limitado conllevando a la necrosis pulpar [64]. La inmunidad innata celular del complejo dentino-pulpar ante la caries, incluye los siguientes componentes: a) Obs; b) células de inmunidad innata; c) citocinas de inmunidad innata; d) quimiocinas [64].

### ***Odontoblastos***

Los Obs son la primera línea de defensa celular del complejo pulpo-dentinario, ya que, debido a su localización anatómica, son las primeras células dentales en enfrentarse con los antígenos bacterianos criogénicos, por lo que su participación es sumamente importante en distintos aspectos. Estas células están constituidas por un cuerpo que se ubica en la pulpa y por una

prolongación que se encuentra en el túbulo dentinario [64]. El citoplasma contiene un citoesqueleto compuesto de una rica red de microtúbulos y filamentos citoplasmáticos que se extienden hasta el final del proceso odontoblástico y que es requerida para el transporte de gránulos de secreción y para la deposición de matriz dentinaria. Durante los períodos de producción de dentina exhiben gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso (RER) y complejo de Golgi a partir de los cuales son originados gránulos de secreción específica que son transportados al polo secretor de la célula (proceso odontoblástico). El colágeno, proteoglicanos, enzimas proteolíticas son algunos de los productos secretados por los Obs [65]. En un diente completamente formado los Obs continúan elaborando matriz dentinaria, pero en mucha menor cantidad. En respuesta a algún estímulo los Obs son capaces de incrementar la cantidad de dentina para formar capas más gruesas de dentina protectora [65]. Durante la dentinogénesis, los Obs elaboran entre 4 a 8  $\mu\text{m}$  de dentina cada día [65]. Los genes de los Obs codifican bajos niveles de CXCL8. Los Obs del TPD normal poseen receptores similares de células como los TLRs que reconocen productos bacterianos como LTA. Los Obs inducen a la producción del VEGF el cual es un estimulador de la angiogénesis y la permeabilidad vascular y estimula a las células pulpares cuando son invadidas por LTA. El TPD normal libera  $\beta$ -defensina 1 ( $\beta\text{D1}$ ) y  $\beta$ -defensina 2 ( $\beta\text{D2}$ ). Esta última, estimula la diferenciación de Obs y su acción bactericida contra microorganismos del grupo de *Streptococcus* y *Lactobacillus*, además de ser quimioatrayentes para células NK,  $\text{T}_{\text{CD4}}$ , linfocitos T de memoria y DCs inmaduras (iDCs). Por ser los Obs atrayentes de células de defensa se sugiere que poseen actividad quimiotáctica y fagocítica. En el TPD, los Obs, secretan el factor de crecimiento transformante Beta ( $\text{TGF-}\beta$ ), y su expresión aumenta en la pulpitis irreversible. El Ob es importante en la dentinogénesis y reparación ya que promueve la secreción de la matriz de metaloproteinasas (MMP) y la mineralización del TD. En la etapa temprana de la inflamación, actúa como proinflamatorio, reclutando y activando células inmunes como DCs y leucocitos a

través de la producción de  $\beta$ D2 y quimiocinas de la familia CXCL (como 8, 10, 12, 14) y CCL (2 y 6), mientras que el LTA inhibe la inducción de TGF $\beta$ 1 por los Obs. En la etapa tardía de infección por caries actúa como antiinflamatorio, reprimiendo la activación de M $\phi$ s y DCs y la proliferación de linfocitos, ya que TGF $\beta$ 1 suprime el procesamiento de antígenos por los TLRs. Se ha sugerido una función fagocítica de los Obs, pero no se ha confirmado [42], [66], [67]. (figura 3)

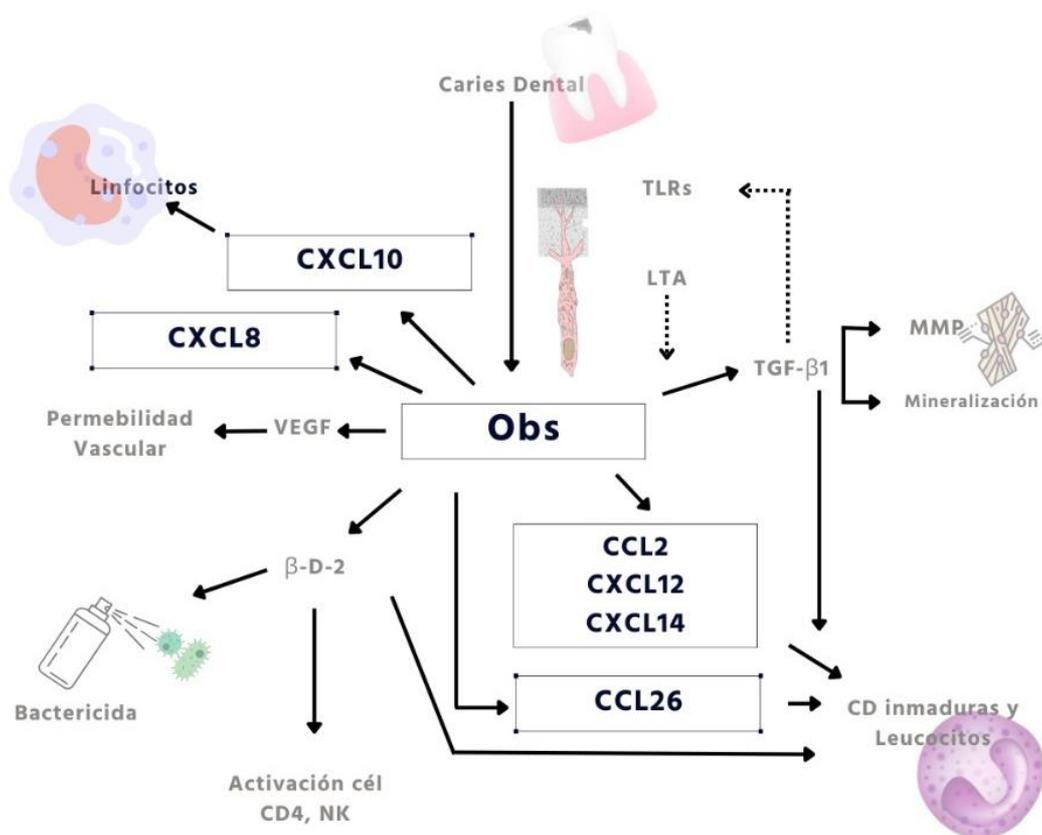


Figura 3. Respuesta inmune innata de los odontoblastos en caries.

Abreviaturas: Ob, odontoblasto; TLR, receptor tipo-Toll; IL, interleucina; CXCL y CCL, quimiocinas; LTA, ácido lipoteicoico; TGF, factor de crecimiento transformante; CD4, linfocito T<sub>CD4</sub>; NK, célula natural killer; DC, célula dendrítica; D, defencina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; MMP, metaloproteinasa. Las quimiocinas secretadas por los odontoblastos se representan en cuadros de texto. Las líneas punteadas representan una regulación negativa. Hahn et al. [30].

### ***Células de la inmunidad innata en el tejido pulpar dental***

La reacción inflamatoria en el TPD como respuesta a una gran variedad de situaciones clínicas han sido descritas y extensamente estudiadas, se ha observado reacciones vasculares, así como migración y acumulación de células inflamatorias, tanto en la fase de respuesta inicial como en la fase reparativa. Hallazgos experimentales han demostrado que los antígenos de microorganismos de la cavidad bucal inducen reacciones inflamatorias en los tejidos de la pulpa a través del TD expuesto [42]. En diversos estudios, se ha demostrado que, bajo condiciones de normalidad, el TPD se encuentra equipada con una variedad de células asociadas con el sistema inmune de defensa [68]–[71].

**Neutrófilos polimorfonucleares (PMN):** Los PMNs pueden no ser de importancia en la inflamación pulpar (pulpitis) reversible, ya que pocos PMN se han observado en el TPD bajo caries superficiales y la barrera física de dentina previene el contacto íntimo entre las bacterias y los PMNs, en cambio, se ha demostrado una acción fagocítica por parte de los Obs en la RII [68].

**Macrófagos (Mφs):** Los Mφs en el TPD se localizan predominantemente en la proximidad de los vasos sanguíneos, muchos estudios han demostrado que hay una gran cantidad de células que liberan antígenos asociados a Mφs y éstas están localizadas en la zona perivascular de la pulpa [69], [70]. Además, el número de Mφs aumenta con la progresión de la caries y siempre es mayor que las DCs en todas las etapas de la invasión de la caries, por lo que estos Mφs pueden ser activados en la etapa temprana de la pulpitis para proteger el TPD, aumentando la permeabilidad vascular y removiendo antígenos extraños y tejido dañado desde la pulpa afectada [71]–[74].

**Células Natural Killer (NK):** Algunos autores llevaron a cabo un estudio inmunohistoquímico en pulpas normales e inflamadas de terceros molares extraídos humanos para identificar y cuantificar las células NK. No observaron células NK en pulpas normales, al

contrario de lo encontrado en pulpas inflamadas, que contenían un intenso infiltrado de células NK [75]. A su vez, estas células se encontraban dispuestas en un patrón focal, posiblemente por la presencia de diferentes factores quimiotácticos para células NK en distintas zonas de la pulpa inflamada o por diversas concentraciones de patógenos en diferentes regiones de la pulpa [76]. Se ha demostrado que en lesiones con caries abunda una gran cantidad de microorganismos *S. mutans*, por lo que son los primeros antígenos procesados por las DCs y Mφs de la pulpa, mostrando que el *S. mutans* activa rápidamente células mononucleares sanguíneas periféricas para producir niveles elevados de INF- $\alpha$  e IL12, por lo que es posible que células NK y el *S. mutans* induzcan la respuesta inflamatoria inicial a la caries. Igualmente, el *S. mutans* puede transformar rápidamente monocitos en DC maduras (DCm) en las primeras 24 horas lo que contribuye a la maduración local de DC en pulpas inflamadas [42].

**Células dendríticas (DCs):** En el sitio de una lesión como caries o preparación de cavidades se produce un rápido acumulo de DCs gracias a la acción quimiotáctica de los neuropéptidos. Se cree que las DCi se localizan en la región odontoblástica y en la predentina, donde, una vez captado el antígeno migran para presentarlo a los linfocitos T [77]. Las DCm producen una gran cantidad de citocinas como IL1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y quimiocinas como CXCL9, CCL2, CCL3, CCL5 y CXCL10 [61]. La importancia de las DC no sólo radica en la inmunosupervivencia y la respuesta inmunológica adquirida, sino también en la diferenciación y regeneración de Obs [77]. Varios estudios, han mostrado estrecha relación de las células que expresan la molécula Clase II del MHC con los Obs y fibras nerviosas localizados en la capa de predentina y odontoblástica, en donde existe una relación dinámica entre las DC y la diferenciación de células similares a Obs después de la lesión. A su vez, el número de DC en la pulpa y fibras nerviosas aumenta en la medida que la caries se profundiza; esto puede explicarse por la propiedad quimiotáctica de los neuropéptidos [66], [78].

## Receptores tipo-Toll en el tejido pulpar dental

Los receptores tipo Toll (TLRs) son una familia evolutivamente conservada de receptores de reconocimiento patrón expresados en varios tipos de células reconociendo productos de una amplia variedad de organismos [17, 18]. (Tabla 3 y 4)

Tabla 3. Ligandos naturales y sintéticos de TLRs

TLR	Expresión en células del sistema inmunes	MAMPs	DAMPs	Naturaleza de las moléculas investigadas en ensayos clínicos
<b>TLR2 (1/6)</b>	B, Mo, Mac, DCs, Plt N, MyDCs, Mc	Lipoproteínas, zimosano, peptidoglicano	HSPs, HMGB1, hialuronano, HDL (modificado)	Lipopéptido, proteína recombinante, anticuerpo
<b>TLR3</b>	DC, B, Plt	dsRNA viral	dsRNA autónomo	Ácido polinosínico- policitílicico (polyIC, poly-ICLC, polyIC12U), anticuerpo anti-TLR3
<b>TLR4</b>	Mo, Mac, N, MyDCs, Mc, B, IE, Plt	Lipopolisacárido	HSPs, fibrinógeno, sulfato de heparina, fibronectina, HA, HMGB1, hialuronano, LDL oxidado, ANG II	Derivados de lípido A (glicolípidos), anticuerpo anti-TLR4, polisacárido
<b>TLR5</b>	Mo, Mac, DC, IE	Flagelina	HMGB1	Flagelo y flagelo basado en moléculas
<b>TLR7</b>	Mo, Mac, pDC, B, Plt	dsRNA viral	dsRNA autónomo	SM
<b>TLR8</b>	Mo, Mac, DC, Mc	dsRNA viral	dsRNA autónomo	SM
<b>TLR9</b>	Mo, Mac, pDC, B, Plt	CpG DNA viral y bacteriano	dsRNA autónomo	DNA, moléculas sintéticas de ssDNA
<b>TLR10</b>	LN, Mo, S, B, L	NA	NA	NA

**Abreviaciones:** ANG II, angiotensina II; B, célula B; MAMPs, patrón molecular asociado a microorganismos; DAPM, patrón molecular asociado a daño; DC, célula dendrítica; dsRNA, RNA de doble cadena; HA, ácido hialurónico; HDL, lipoproteína de alta densidad; HMGB1, proteína de alta movilidad; HSPs, proteínas de choque térmico; IE, epitelio intestinal; L, pulmón; LC, célula hepática; LDL, lipoproteína de baja densidad; LN, ganglio linfático; Mac, macrófago; Mc, célula cebada; Mo, monocito; MyDC, célula dendrítica mieloide; N, neutrófilo; NA, no aplica; PAMP, patrón molecular asociado a patógenos; pDC, DC plasmocitoide; Plt, plaqueta; S, bazo; SM, molécula pequeña; ssRNA, ARN de cadena sencilla; TLR, receptor tipo-Toll. Modificado de Anwar MA et al 2018 [79].

Tabla 4. Expresión de TLR en células no inmunes

<b>Célula</b>	<b>TLR</b>
Miofibroblasto intestinal	TLR 1-9
Fibroblasto gingival	TLR2, TLR4
Adipocito	TLR2
Osteoblasto	TLR2, TLR4, TLR6
Osteoclasto	TLR4
<b>*Odontoblasto</b>	<b>TLR 1-6, 9.</b>

Tomado y modificado de Mesa-Villanueva y cols. [80]; \*Hanks y cols. [81]

El TLR fue originalmente identificado como un receptor relacionado en la embriogénesis de la mosca *Drosophila*, pero subsecuentemente se descubrió que la proteína Toll también regula respuestas antimicrobianas. Este descubrimiento dio paso a la identificación de homólogos del receptor Toll en mamíferos, los cuales fueron llamados receptores tipo Toll (TLRs). Hay 10 tipos diferentes de TLRs funcionales en humanos, llamados TLR1 al TLR10 (Figura 3) [79], [82], [83]. El reconocimiento de los TLRs de ligandos microbianos resulta en la activación de varias vías de señalización y últimamente en factores de transcripción, los cuales inducen la expresión de genes cuyos productos son importantes para las respuestas inflamatorias [84]–[87]. (Figura 4)

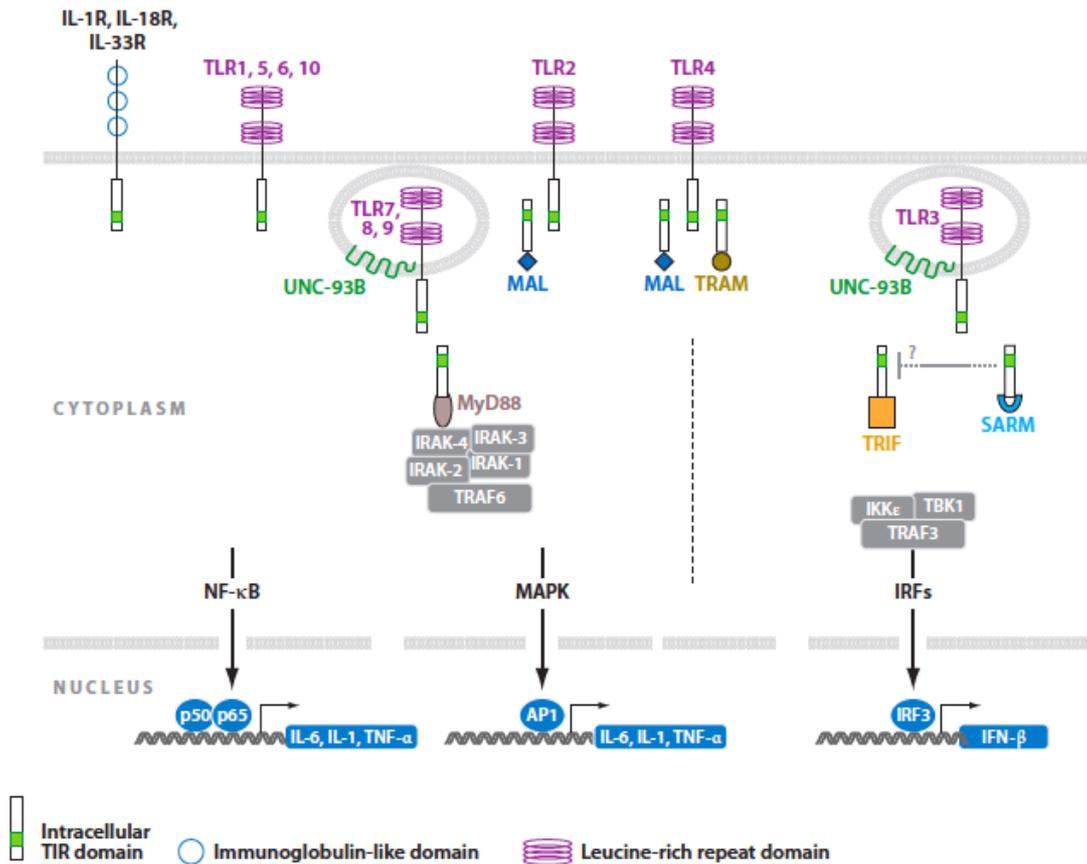


Figura 4. Estructura, localización, especificidad y señalización de los TLRs en mamíferos.

Los TLRs son expresados en la superficie celular y en el endosoma. Tomado de Casanova JL et al 2011 [84].

Algunos autores determinaron la expresión de TLR4 en Obs de pulpas dentales humanas normales y observaron la expresión de RNAm de TLR4 en células de la capa odontoblástica y especímenes de pulpas dentales realizando pruebas de Transcriptasa reversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) y concluyeron que los TLR4 son expresados en Obs pero no en los Fbs del TPD lo que indica que los TLR4 expresados en Obs pueden jugar un papel importante en la defensa inmune del complejo pulpo-dentinario [36].

### *Citocinas de la inmunidad innata del tejido pulpar dental*

Las citocinas son un grupo amplio y heterogéneo de proteínas secretadas y producidas por muchos tipos celulares; regulan todos los aspectos de la inmunidad innata y adaptativa. Son

producidas por células de la inmunidad innata como DCs, MΦ y mastocitos, y conducen los procesos de inflamación o contribuyen a la defensa contra infecciones virales [84], [85], [87], [88]. Las citocinas se dividen en: citocinas, quimiocinas, interferones, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral. Tres de las más importantes citocinas proinflamatorias de la RII son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), IL1 $\beta$  e IL6. Los MΦ epiteliales y mastocitos son la mayor fuente de estas citocinas, aunque otros tipos celulares, también pueden producir IL1 e IL6, [84]–[87].

Entre las funciones generales de las citocinas tenemos:

- a) Estimulan el crecimiento y diferenciación de los linfocitos (fase de activación).
- b) Activan diferentes células efectoras para que eliminen microorganismos y otros antígenos (fase efectora).
- c) Estimulan el desarrollo de las células hematopoyéticas.

Algunas características de las citocinas son [84], [85], [87], [88]:

- a) Regulan el tránsito de linfocitos y otros leucocitos de los tejidos linfáticos periféricos.
- b) Favorecen la angiogénesis y curación de las heridas.
- c) Participan en el desarrollo de ciertos órganos no linfáticos: cerebro y corazón.

En general, las citocinas son producidas por diferentes poblaciones celulares, actúan en diferentes células blanco y tiene otras propiedades diferentes. Sin embargo, estas distinciones no son absolutas porque las mismas citocinas pueden ser producidas durante la RII y adaptativa y diferentes citocinas producidas durante ciertas reacciones pueden tener diferentes acciones [84], [85], [87], [88]. Una de las respuestas más tempranas del sistema inmune innato a la

infección y daño tisular es la secreción de citocinas a través de células tisulares, las cuales son críticas para la respuesta aguda inflamatoria.

Se sabe que, las bacterias cariogénicas y sus componentes inducen la producción de mediadores polipeptídicos o citocinas inmunes por células inflamatorias, las citocinas secretadas por las células de la inmunidad innata incluyen el TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL12, IL18, INF $\alpha$ , IL6 e IL10 [42]. El TNF- $\alpha$  y la IL1 $\beta$  son rápidamente producidas por M $\phi$ s activados para reclutar PMNs y monocitos al sitio de la infección por medio de la expresión de moléculas de adhesión que promueven la extravasación de fagocitos durante la inflamación, así mismo, las paredes celulares de las bacterias grampositivas estimulan la liberación de TNF- $\alpha$ , mientras que la pared celular de las bacterias gramnegativas específicamente los LPS inducen a las células del TPD a la producción de IL1 $\beta$  e IL6 [38], [89]. El TNF- $\alpha$  tiene un potente efecto quimiotáctico para los PMNs, así mismo produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular produciendo la extravasación de los leucocitos de la sangre al área infectada, se han observado grandes concentraciones de TNF $\alpha$  en pulpitis irreversible sintomática en comparación con el TPD y a medida que esta pulpitis avanza, la concentración de TNF $\alpha$  disminuye, esto se cree que es por la finalización de la inflamación y el comienzo de la necrosis pulpar [69], [76], [78]. En dientes con caries se ha demostrado por medio de ensayos biológicos e inmunohistoquímicos que la pulpa presenta niveles elevados de IL1 $\beta$  liberada por los M $\phi$ s pulpares que se encuentran en el estroma del tejido conectivo [60]. También se ha demostrado que los niveles de IL1 $\beta$  en el TPD aumentan en presencia de LPS de *Porphyromonas endodontalis*, por lo que esta citocina está directamente involucrada en la respuesta pulpar inflamatoria a la invasión bacteriana [90]–[93].

### *Quimiocinas en el tejido pulpar dental*

Las quimiocinas son una familia de citocinas de bajo peso molecular y estructuralmente homologas. Su nombre es una contracción de "citocina quimiotáctica" [1, 20-22]. Tienen un papel crítico como iniciadoras y promotoras de las reacciones inflamatorias, ya que regulan el tráfico y afluencia celular al estimular el movimiento leucocitario al sitio de la inflamación y regular la migración y reclutamiento de leucocitos circundantes de los vasos sanguíneos hacia los sitios extravasculares (atrayéndolos al sitio de infección y estimulando su migración extravascular): E $\phi$ s, linfocitos T y B, monocitos M $\Phi$ , DCs, PMNs, y determinan un incremento de su adhesión a las células endoteliales y/o su activación. Las quimiocinas están involucradas en el desarrollo de órganos linfáticos, y éstas regulan el tráfico de linfocitos a través de los tejidos linfoides periféricos. Las quimiocinas son requeridas para la migración de las DCs a los sitios de infección a través de los nodos linfáticos [84], [94]–[96]. Las quimiocinas no sólo dirigen la migración de PMNs y monocitos, sino que también atraen a DC inmaduras (DCi) y activan linfocitos T de memoria y efectores durante la infección [80].

#### *Interleucina 8 (CXCL8)*

La CXCL8 es una citocina quimiotáctica que actúa fijándose a la matriz extracelular o al endotelio [97], [98]. La fuente celular principal de la CXCL8 son los monocitos/macrófagos, pero es secretada por otras células incluyendo Obs y Fbs pulpares, queratinocitos, hepatocitos y células endoteliales. Sus efectos principales son la quimiotaxia de PMN y células T. El efecto de la CXCL8 sobre los PMN, consiste en inducir a la degranulación y la liberación de enzimas que causan la destrucción tisular [42], [97]. Además, la CXCL8 producida por los Obs y Fbs del TPD recluta, por afinidad de integrinas y estimulación de la migración extravascular, otras células inmunes como DCi, linfocitos T y B, Células NK y B $\phi$ s.[42], [97], [98]

Por medio de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), inmunohistoquímica y análisis de Northern Blot, se ha determinado la presencia de CXCL8 en TPD normales y en TPD

irreversiblemente inflamados, los hallazgos revelaron un aumento significativo de la CXCL8, en 71% de las pulpas inflamadas en comparación con 53% de las pulpas normales. Se ha observado que la CXCL8 es producida por los Obs, pero es producida predominante por macrófagos y linfocitos, sobre todo en TPD inflamados [97], [98]. Es posible que los productos bacterianos como lipopolisacáridos, puedan estimular y aumentar la producción de la CXCL8 por parte de Obs para reclutar leucocitos. A medida que la caries progresa, más células pulpares se ven involucradas en la producción de CXCL8. Esto resulta en la formación de microabscesos, caracterizados por un acumulo de PMNs que puede ceder y dar lugar a la inflamación crónica con Mφs y linfocitos como células predominantes. Como se mencionó anteriormente, las bacterias se relacionan con la liberación de CXCL8. El LPS de bacterias gram negativas como *P. intermedia*, liberan CXCL8 y ésta es producida por Fbs pulpares. En los Fbs gingivales, hay una liberación de CXCL8 llegando a un máximo nivel a las 12h, en comparación con Fbs pulpares en donde su liberación se inicia a las 2h y llega al máximo nivel de 4 a 8h. Debido a que el TPD está rodeado por dentina, su propiedad de expansión es limitada, a diferencia del tejido gingival. Igualmente, la pulpa carece de circulación colateral a pesar de que hay algunos vasos sanguíneos que suplen el TPD por medio de conductos accesorios; sin embargo, esto no se considera una circulación colateral óptima como la de otros tejidos conjuntivos. Es por esto, que los Fbs pulpares son más sensibles a la liberación de CXCL8 en presencia de pequeñas cantidades de estímulo bacteriano [97], [98].

De todo lo mencionado anteriormente, se puede concluir que la inflamación del TPD es un proceso complejo que incluye una gran variedad de reacciones nerviosas y vasculares, las cuales son componentes claves de la inflamación neurogénica que pueden llevar a la necrosis pulpar [58]. (figura 5)

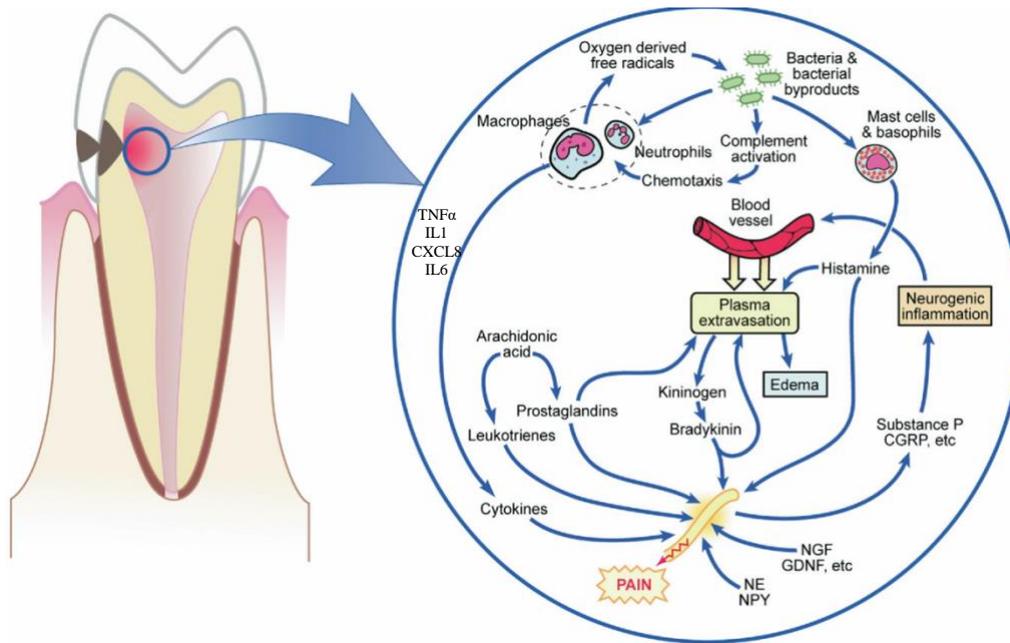


Figura 5. Modelo de respuesta inflamatoria e inmunológica del tejido pulpar en caries.

*TNF*: factor de necrosis tumoral; *IL*: interleucina; *CGRP*: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; *NGF*: factor de crecimiento neuronal; *GDNF* factor neurotrófico derivado de células gliales; *NE*: norepinefrina; *NPY*: neuropeptido Y. Modificado de Owatz, et al [47].

### **Microbioma oral humano**

El ser humano no es un organismo eucarionte independiente, coexiste en equilibrio con varios organismos (por ejemplo, comensales, simbioses y patobiontes). Los organismos, junto con sus productos biológicos y su carga genética, habitan la superficie y el interior del cuerpo formando un órgano operativo único conocido como microbioma humano que es crucial para nuestra salud y fisiología [99]–[102]. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, el equilibrio entre los comensales y los patobiontes puede romperse y, en consecuencia, crear un estado de desequilibrio microbiano conocido como disbiosis que puede ser un factor contribuyente de enfermedad. Además, la diversidad y el equilibrio del microbioma están influenciados por factores como el desarrollo humano, la susceptibilidad genética e incluso la localización geográfica. Por lo tanto, se sabe que algunos individuos en ciertas etapas de la vida o diferentes etnias pueden ser más susceptibles a ciertas enfermedades asociadas con la disbiosis en

comparación con otros grupos. Actualmente se sabe que la cavidad oral alberga la segunda MB más abundante después del tracto gastrointestinal [103] y se ha demostrado que los taxones bacterianos específicos que colonizan la boca (también llamado microbiota bacteriana [MB] o bacterioma) se asocian con diferentes enfermedades locales y sistémicas. Sin embargo, los estudios del HOM sólo se han realizado en ciertas poblaciones, por lo que sería importante revisar ciertos factores del hospedero, intrínsecos o extrínsecos, con el fin de tener un mejor entendimiento de cómo la variabilidad inter- e intraindividual podría influir en el HOM en estados de salud o enfermedad en diferentes poblaciones.

### ***Variabilidad del microbioma oral***

La composición del microbioma oral es relativamente estable a lo largo de la vida, sin embargo, es posible observar cambios en el microbioma oral a lo largo de diferentes etapas en un individuo o entre individuos. La gran variabilidad que presenta el HOM, esta reportada actualmente en la *expanded* Human Oral Microbiome Database (*eHOMD*), que incluye 771 especies microbianas, de las cuales, 57% son nombradas oficialmente, 13% sin nombre pero cultivables y 30% son conocidas sólo como phylotipos no cultivables, así como un total de 1.570 genomas, que representan 475 taxones (85% cultivables) de los cuales las phyla *Actinobacterias*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacterias* y *Proteobacterias* junto con sus respectivos géneros y especies son las poblaciones bacterianas más representativas en la cavidad oral [12], [104].

### ***El factor demográfico en la variabilidad del microbioma oral.***

La composición del microbioma oral no sólo está influenciada por la edad e ingesta de medicamentos, sino también por variables adicionales, incluyendo la genética del hospedero, el sexo biológico del huésped, la etnicidad y la geografía, las cuales pueden reflejar en los etilos

de vida, variaciones en la dieta y la convivencia de cada individuo [105]. Por ejemplo, estudios comparativos entre poblaciones europeas, africanas, asiáticas y norteamericanas mostraron una variación microbiana entre poblaciones, así como un microbioma oral conservado en grupos étnicos específicos con diferencias interindividuales, p. ej. un estudio en poblaciones norteamericanas reportó que las phyla *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Actinobacterias* y géneros *Streptococcus* spp., *Haemphilus* spp., *Neisseria* spp., *Prevotella* spp., *Veillonella* spp. y *Rothia* spp. fueron los más abundantes. Con relación a lo anterior, en conjunto, tanto la migración y la adaptación a otra cultura son factores contribuyentes asociados con el cambio y la transición microbiana en la cavidad oral y particularmente se ha reportado que la migración y tiempo de residencia a una localidad más urbanizada se asocia negativamente con la riqueza microbiana oral. Con base en lo anterior, en un grupo de mujeres migrantes mexicoamericanas la presencia de *Streptococcus* spp. se ha asociado positivamente con obesidad y *disminución* de la diversidad bacteriana oral, mientras que la presencia de *Prevotella* spp. se propuso como un indicador de un mayor tiempo de residencia en su país de origen. La diferencia demográfica entre *Streptococcus* spp. y *Prevotella* spp. reportada anteriormente coincide con la hipótesis de una firma microbiana oral entre las mujeres más aculturadas [106]. Adicionalmente, la composición de un microbioma oral saludable también podría estar dirigida por un componente específico del género [107]. Con base en lo anterior, en un grupo nigeriano se observaron taxones exclusivos de acuerdo con el sexo, donde *Anaerococcus* spp., *Anoxybacillus* spp., *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Bulleida* spp., *Actinomyces oris*, *Actinomyces* sp., *Arthrobacter albus*, *Bacteroides coprocola* fueron géneros y especies bacterianas exclusivas en mujeres, mientras que *Altererythrobacter* spp., *Blautia* spp., *Citrobacter* spp., *Desulfobulbus* spp., *Kluyvera* spp., *Actinobacillus delphinicola*, *Actinomyces meyeri*, *Blautia faecis* eran exclusivas en hombres [108]. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de la presencia de un microgenderoma oral [108] que define la comunicación entre

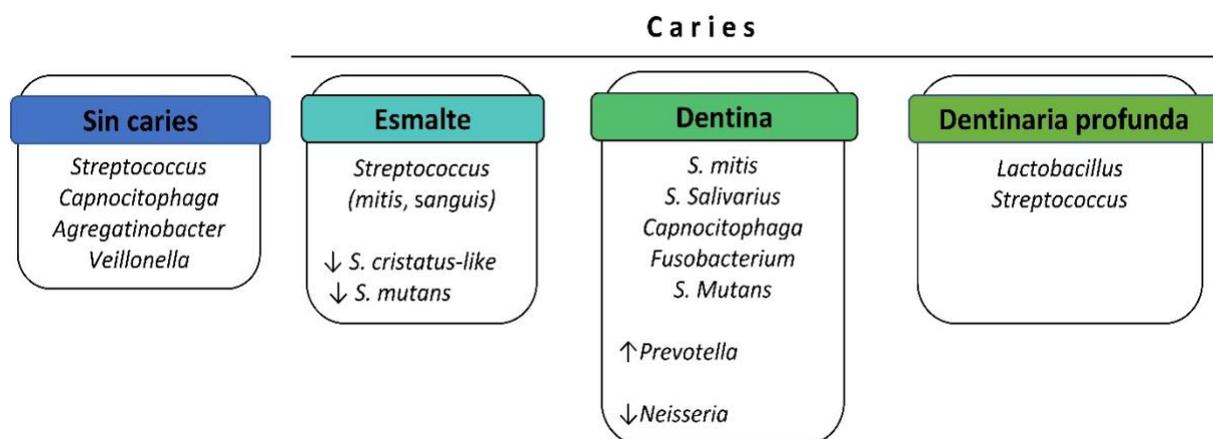
la MB, las hormonas sexuales y el sistema inmunitario a través de la comunicación bidireccional con el sistema endocrino [109]–[111].

***Microbioma en saliva y placa dentobacteriana entre diferentes poblaciones.***

La lengua, los dientes, la mucosa oral y el paladar albergan una MB distintiva para cada nicho. Tal es el caso de *Pasteurellaceae* spp. y *Streptococcus* spp. observadas en todas las áreas de la cavidad oral, así como *Fusobacterium* spp. y/o *Prevotella* spp. en amígdalas y garganta y *Veillonella* spp. observada en el paladar duro, amígdalas, garganta y parte posterior de la lengua. Sin embargo, se reconocen cambios basados en la geografía y la edad. Por ejemplo, el microbioma salival en daneses muestra estabilidad a largo plazo y se observan géneros como *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp., *Rothia* spp. y *Neisseria* spp. así como las especies periodontopatógenas *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* y *Parvimonas micra*. De manera contrastante, en una población española, el microbioma salival reporta la presencia de los géneros *Prevotella* spp. y *Veillonella* spp., mientras que en la PDB se han observado marcadas diferencias en la diversidad bacteriana de acuerdo con el sitio anatómico [112]. En contraste, en una población japonesa con un estado de salud periodontal, se pueden observar cambios de inter e intra individuales, donde se ha observado que las phyla *Actinobacterias*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *SRI* y *Synergistes* varían significativamente a nivel interindividual, pero éstas se mantienen estables a nivel intraindividual, con excepción de *SRI* y *Synergistes* spp. Lo anterior muestra que el microbioma oral es significativamente más distante de manera interindividual que de manera intraindividual, incluso entre diferentes poblaciones, lo podría apoyar la propuesta del uso del microbioma oral como huella digital [113].

### ***Microbioma cariogénico entre poblaciones adultas***

La caries es una enfermedad que en etapas avanzadas puede desencadenar condiciones clínicas muy graves, especialmente infecciones que requieren tratamientos dentales complicados e invasivos. Adicionalmente, no hay que olvidar que las interacciones bacterianas entre diferentes géneros y especies (incluso del mismo género) son relevantes para el desarrollo de este padecimiento. Tal es el caso de *Streptococcus* spp. que tiende a formar relaciones estrechas con *Rothia* spp., *Actinomyces* spp. y *Selenomonas* spp. lo que es un factor predictivo de la caries del TD y que también está altamente conectada a *Tannerella* spp. y *P. olorum* [114]. Considerando lo anterior, en una población española se reportó que el género *Actinomyces* spp. fue significativamente abundante en estado de salud oral, mientras que *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Tannerella* spp. y *Leptotrichia* spp. eran más abundantes en caries [14]. Adicionalmente, se observó que conforme la caries avanza a través de los tejidos dentales, la diversidad del microbioma oral disminuye y se modifica [115]. Otros hallazgos en población danesa reportaron que *S. salivarius* se observó a menudo en presencia de caries [116] (figura 6).



*Figura 6. Microbioma oral asociado a caries en adultos. Reemplazo de la estructura ecológica de la microbiota bacteriana en diferentes etapas de caries, de acuerdo con su avance en los tejidos dentales. Los microorganismos señalados con flechas se caracterizan por presentar disminución ( ↓ ) o incremento ( ↑ ) de su abundancia. [13]*

## Justificación

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 3.580 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por enfermedades orales, siendo la más común la caries. En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB, 2020) informó que la caries afecta al 93.3% de la población mexicana de entre 20 y 85 años y alrededor del 50% de los niños, niñas y adolescentes.

Adicionalmente, si esta enfermedad no se trata a tiempo conduce a daños en el TPD y, finalmente, a la pérdida de órganos dentales. Por lo anterior, la caries es considerada un problema de salud pública. Por otra parte, es bien sabido que el principal factor etiológico de la caries es la disbiosis. En consecuencia, el TPD está expuesto a una gran cantidad de componentes antigénicos provenientes de diferentes bacterias cariogénicas, por lo que puede desarrollar un proceso de inflamación (reversible e irreversible, en etapas avanzadas) dirigido por diferentes marcadores moleculares. En ese punto, las infecciones pulpares pueden inducir periodontitis apical, caracterizada por la destrucción del hueso periodontal; lo que favorece la traslocación [117] de microorganismos asociados a enfermedades orales exacerbando alteraciones a nivel sistémico[118]–[120].

Ya que son pocos los estudios que integran el estudio del microbioma de la caries y la respuesta inflamatoria del TPD en la presencia de esta patología dental, para tener una mejor comprensión de cómo el tejido pulpar humano responde a la caries, es necesario evaluar de manera conjunta, los cambios en la diversidad microbiana que acompañan a la caries, así como la respuesta inmune *in situ* del TPD. Por otro lado, en la última década la participación del microbioma oral ha sido asociada a diferentes alteraciones sistémicas [118]–[120].

Sin embargo, la variabilidad y equilibrio del microbioma están influenciados por factores como el desarrollo humano, la susceptibilidad genética e incluso la localización geográfica. Así

mismo, su estudio se ha limitado a ciertas poblaciones. Ya que aún no hay información en nuestro país que reporte la diversidad del microbioma oral y el papel que puede estar desempeñando en la RII del TPD en caries moderada este estudio detallará, a nivel de secuenciación genómica por amplicones (16SrRNA), la estructura y composición ecosistémica del microbioma oral asociado a caries dentinaria y la participación de diferentes marcadores inflamatorios del TPD, complementando la información ya reportada.

## **Hipótesis**

La expresión de TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TGF $\beta$  y CXCL8 se incrementará en el tejido pulpar dental en presencia de caries moderada de dentina y se correlaciona con el tipo de microbiota presente en las lesiones dentales. No queda justificado en los antecedentes porque seleccionaste TLR2 y 4 y no otros TLRs.

## **Objetivos**

### **General**

Conocer la relación entre la respuesta inmune innata (RII) y el microbioma mediante la cuantificación de la expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4,) y marcadores inflamatorios (citocinas TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TGF $\beta$  y una quimiocina CXCL8) en el tejido pulpar dental, expuesto o no a la dentina cariada y correlacionar esta información con la estructura y composición taxonómica de la microbiota oral bacteriana presente en dientes sanos y en caries en un grupo de mexicanos.

### **Específicos**

- Caracterizar la estructura y composición taxonómica de la microbiota oral bacteriana presente en sanos y en caries de dientes permanentes en adultos.
- Describir los perfiles bacterianos asociados con los dientes libres de caries y de caries activa.
- Cuantificar la expresión de TLRs y marcadores inflamatorios en el tejido pulpar dental.
- Explorar las relaciones no estocásticas entre la microbiota oral y los marcadores de respuesta inmune innata.

## **Métodos**

### ***Diseño del estudio***

Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM) [121] sobre experimentación con sujetos humanos y, fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo el registro de aprobación de proyecto FM/DI/030/SR/2019.

Se reclutaron de manera consecutiva sujetos adultos a quienes se les extrajo algún diente por indicación clínica de razones de ortodoncia o rehabilitación protésica dental en las clínicas de cirugía maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los participantes fueron informados sobre el objetivo del estudio y firmaron un "Formulario de Consentimiento informado y libre" según lo requerido por el Comité de Ética en Investigación.

### ***Criterios de selección***

#### ***Subjetos de estudio***

Los sujetos que cumplieron con los siguientes criterios fueron reclutados en el estudio:  $\geq 18$  años de edad, ambos sexos, referidos a las clínicas de cirugía maxilofacial y que voluntariamente aceptaron donar dientes extraídos. Los criterios de exclusión fueron embarazo, lactancia, tabaquismo, enfermedad periodontal, cualquier padecimiento crónico-degenerativo y de carácter inflamatorio. Reporte de antibióticos sistémicos, así como tratamiento periodontal y/o de ortodoncia tres meses previos a la participación en el estudio. 31 sujetos donaron 31 dientes.

### *Órganos dentarios*

Se utilizaron órganos dentarios (llamados dientes) donados voluntariamente por los participantes y que cumplían los siguientes criterios: dientes recién extraídos ( $\leq 24$  horas), vitales, permanentes, maduros, anteriores y/o posteriores (premolares y molares), que presentaban una lesión de caries activa moderada que afectaba el tejido dentinario o libre de caries primaria. Criterios de exclusión: cualquier obturación dental temporal o permanente, tratamientos restauradores, exposición del tejido del TPD, necrosis pulpar, periodontitis apical crónica, cualquier otro grado de caries que no fuera caries moderada de dentina.

### *Colección de las muestras*

La clasificación, colección y procesamiento de las diferentes muestras (dientes, PDB, TPD y dentina cariada) de este estudio fueron llevados a cabo por un dentista clínico (APGG) capacitado en la identificación de lesiones visibles de caries, muestreo y colección de PDB y dentina con caries.

### *Órganos dentarios*

De acuerdo con los criterios de elegibilidad, treinta y un dientes, principalmente premolares y molares, fueron recolectados y almacenados en un contenedor nuevo y estéril con solución fisiológica estéril. Los dientes se clasificaron en dos grupos, dientes libres de caries ( $n = 14$ ) o con caries ( $n = 17$ ). Los dientes extraídos fueron transportados en hielo a la Unidad de Investigación UNAM-INC. Los dientes no procesados el mismo día de la colección para llevar a cabo los ensayos subsecuentes, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### *Placa dentobacteriana supragingival*

Las muestras de PDB se recogieron antes de la extracción dental. Se pidió a los sujetos que se abstuvieran de la higiene oral: cepillarse los dientes, usar hilo dental, enjuagarse la boca y consumir chicles durante al menos 24 horas antes del muestreo de PDB. Antes de iniciar el muestreo de PDB, se colocaron rollos de algodón en la cavidad oral para evitar la contaminación de la saliva. Las muestras de PDB se deslizaron en el cuadrante inferior (izquierdo o derecho) del lado vestibular utilizando un Hu-Friedy estéril esterilizado en autoclave (Hu-Friedy© Mfg. Co., LLC, Chicago; IL, Estados Unidos) excavador de dentina [23], [55]. Las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf estériles nuevos libres de RNAsas/DNAsas que contenían 500 µl de etanol al 70% (Sigma-Aldrich® Co. LLC, Saint Louis, MO, US) y se enviaron a la Unidad de Investigación UNAM-INC para ensayos adicionales. Las muestras de PDB no procesadas el mismo día de la recolección se almacenaron a - 20°C.

### *Tejido pulpar dental*

Todas las muestras de TPD fueron procesadas en la Unidad de Investigación UNAM-INC y extraídas en condiciones estériles. Para extraer y coleccionar el TPD de los dientes sanos y con caries, se trazó un surco longitudinal a lo largo de la superficie del diente utilizando un disco de diamante, un motor de baja velocidad e irrigando con solución fisiológica estéril con una jeringa estéril. Posteriormente, para exponer el DPT, el diente fue seccionado con un martillo y cincel estériles autoclavables. Después, el DPT se retiró suavemente usando un excavador de dentina afilado y pinzas dentales Hu-Friedy estériles y autoclavables. El TPD se depositó en un tubo Eppendorf estéril nuevo libre de RNAsas/DNAsas que contenía 500 µl de TRIzol® (Life Technologies, San Diego, CA, US) y se maceró con un pistilo estéril autoclavable.

### *Tejido dentinario cariado*

Después de las extracciones dentales, los dientes fueron enviados a la Unidad de Investigación UNAM-INC. La caries moderada del TD se confirmó, mediante examen visual, como lesiones moderadas que se extendían al tercio externo o medio del tejido dentinario (TD) [122]. El TD se extrajo a criterio del operador por dos métodos: a) por raspando usando un excavador de dentina afilado estéril y autoclavable (Hu-Friedy© Mfg. Co., LLC, Chicago; IL, Estados Unidos) o una lima de endodoncia nueva estéril autoclavable; b) por pulverización de la superficie cariada usando un ultrasonido endodóntico bajo condiciones de esterilidad [55], [123]. Las muestras se colocaron por separado en tubos Eppendorf estériles nuevos libres de RNasas/DNasas que contenían 500µl de etanol al 70%. Las muestras no procesadas el mismo día de la colección del TD, almacenaron a - 20°C grados hasta el siguiente paso.

### ***Extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras colectadas***

#### *Extracción de RNA a partir de tejido pulpar dental*

El RNA total (tRNA) se aisló usando el reactivo TRIzol® (Life Technologies, San Diego, CA, US), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y con base en lo descrito por *Chomczynski* (1993) [30]. El pellet de tRNA se resuspendió en 50 µl de agua estéril de grado de biología molecular. La concentración y pureza del tRNA se determinó por triplicado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher Scientific Waltham, MA, US), se calculó el valor medio para cada muestra. Se consideran muestras de buena calidad aquellas con un índice de absorbancia  $A_{260/280} \geq 1.8$ . La integridad del tRNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y por visualización de las bandas ribosomales 28S y 18S en un transiluminador UV ChemiDoc MP™ (Bio-Rad Hercules, CA, US). Las imágenes del gel se tomaron con una cámara digital. Adicionalmente, la

integridad del tRNA, también se confirmó mediante electroforesis capilar en un bioanalizador Agilent 2100 (Santa Clara, CA, US), considerando un valor de integridad de RNA (RIN)  $\geq 6.0$ .

#### *Extracción de DNA a partir de placa dentobacteriana y tejido de detina*

EL DNA total (tDNA) se extrajo usando el QIamp® DNA mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Adicionalmente, se eliminó el RNA remanente por digestión con RNasa (10 mg/ml). La concentración y pureza del tDNA se determinaron por triplicado utilizando el aparato NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), se calculó el valor medio para cada muestra. Se consideran muestras de buena calidad aquellas con un índice de absorbancia  $A_{260/280} \geq 1.8$ . Posteriormente, la integridad del tDNA se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y por visualización de la banda de DNA en un transiluminador UV ChemiDoc MP™ Bio-Rad.

#### ***RT-qPCR a partir del tejido pulpar dental***

##### *Retrotranscripción (RT)-qPCR*

Se procesaron 500 ng de tRNA usando un kit libre™ de DNA TURBO DNasa (2 U/ $\mu$ l) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, US). A continuación, se realizó la RT del RNA mensajero (mRNA), a partir de 100 ng de RNAt con el kit de transcriptasa inversa Superscript II™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EU) utilizando un termociclador de PCR punto final Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems LLC, Bedford, MA, US) y oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EU). El protocolo de RT se estableció en paso inicial a 65°C durante 5 min, seguido de una transcripción inversa a 42°C durante 52 min, y una inactivación final a 70°C durante 15 min. El DNA complementario (cDNA) obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

### *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)*

El cDNA se amplificó con oligonucleotidos específicos para cada marcador inflamatorio (Tabla 5) utilizando el kit NZY qPCR Green Master mix 2X (NZYtech Lisboa, Portugal). Los marcadores fueron: Receptor tipo-Toll 2 (TLR2) y Receptor tipo-Toll 4 (TLR4), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL6), quimiocina C-X-C motivo ligando quimiocina 8 (CXCL8), interleucina (IL10) y factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ). La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 15 seg, alineación a 57°C durante 30 seg, y una extensión a 72°C durante 45 seg, para un total de 34 ciclos. Después de la amplificación, la especificidad de cada amplicón de PCR se determinó analizando la curva de fusión (melt curve) para cada amplificado y visualizando todos los fragmentos de amplicones en gel de agarosa al 2%. Cada muestra fue leída por duplicado. Se utilizaron tres controles internos: macrófagos humanos estimulados con lipopolisacárido (hM $\phi$ /LPS), control no RT sin cDNA (NTC) y sin la enzima transcriptasa (NRT). Los datos fueron obtenidos y examinados en un termociclador de tiempo real Bio-Rad CFX96™ (Bio-Rad, Hercules, CA, US). Los resultados se normalizaron con el método 2- $\Delta\Delta$ Ct y usando los genes endógenos de beta-actina ( $\beta$ Act) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 5. Secuencias de oligonucleotidos

Referencia	Gen	Sentido 5' - 3' Antisentido 5' - 3'	Longitud (nt)	Amplicon (pb)	Tm °C	C-G %
NM_001318787.2	TLR2	CAA TGA TGC TGC CAT TCT CAT ATT ATC TTC CGC AGC TTG CA	21 20	83	60 58	42.9 45
NM_138554.5	TLR4	AGT TTC CTG CAA TGG ATC AAG G CTG CTT ATC TGA AGG TGT TGC AC	22 23	83	64 68	45.5 47.8
NM_000576.3	IL1 $\beta$	GGA TAT GGA GCA ACA AGT GG ATG TAC CAG TTG GGG AAC TG	20 20	264	60 60	50 50
NM_000600.5	IL6	GAG CTG TGC AGA TGA GTA CAA GGA CTG CAG GAA CTC CTT AAA	21 21	190	62 62	47.6 47.6
NM_000584.4	CXCL8	TGA AGT GTT GAA GTA GAT TTG C TGA GAG TGA TTG AGA GTG GA	22 20	224	60 58	36 45
NM_000572.3	IL10	GCT GGA GA CTT TAA GGG TTA C GAT GTC TGG GTC TTG GTT CTC	22 21	106	66 64	50 52.4
NM_000594.3	TNF $\alpha$	CCT GCC CCA ATC CCT TTA TT CCC TAA GCC CCC AAT TCT CT	20 20	81	60 62	50 55
NM_000660.7	TGF $\beta$	GCG TGC TAA TGG TGG AAA C CGG TGA CAT CAA AAG ATA ACC AC	19 23	277	58 66	52.6 43.5
NM_001101.5	$\beta$ actina	TCC CTG GAG AAG AGC TAC G TAG TTT CGT GGA TGC CAC A	19 19	130	60 56	57.9 47.4
NM_001256799.2	GADPH	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC TGG TGA AGA CGC CAG TGG A	20 19	138	64 60	60 57.9

Abreviaturas. TLR2: Receptor tipo Toll 2; TLR4: Receptor tipo Toll 4; IL1 $\beta$ : interleucina 1 beta; IL6: interleucina 6; CXCL8: quimiocina 8; IL10: citocina 10; TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta; GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; nt: nucleótido; pb: par de bases; Tm: temperatura de fusión.

### ***Secuenciación por amplicones del gen 16S rRNA a partir de placa dentobacteriana y tejido dentinario***

Las muestras de DNAt que cumplieron con los criterios de calidad suficientes para llevar a cabo los análisis se enviaron a Macrogen Co., LTD (Gasandong, Seúl, Corea del Sur) para la secuenciación por amplicones de las regiones V3 – V4 del gen *16S rRNA* en el sistema Illumina MiSeq, Paired-end 2 $\times$ 300 bp, (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Los oligonucleótidos utilizados fueron: 341F (CTT ACG GGN GGC WGC AG) y 805R (GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC) [124]. La amplificación por PCR, las bibliotecas y la secuenciación se realizaron de acuerdo con los protocolos de Illumina Macrogen. Todas las muestras fueron secuenciadas en la misma plataforma de secuenciación.

## Análisis bioinformático de la región V3 – V4 del gen *16S rRNA*

Las secuencias crudas pareadas demultiplexadas se importaron a QIIME2-2020.8 (Quantitative Insights into Microbial Ecology 2) [125]. Primero, se eliminaron los oligonucleótidos con q2-cutadapt [126], después las secuencias de baja calidad y quimeras fueron removidas, así como los oligonucleótidos 341F y 805R en los extremos forward y reverse de las secuencias; las secuencias remanentes y de buena calidad se ensamblaron [124], [127], [128]. Las lecturas se filtraron para la longitud de 260 pb y 210 en los extremos 5' y 3' con una superposición mínima de 12 pb. Posteriormente, las lecturas se analizaron con q2-dada2 [129] para obtener las variantes de secuencia de amplicones (ASV). Para la asignación taxonómica, se usó el q2-feature-classifier [130] y un clasificador de taxonomía Bayes naïve entrenado para las regiones V3 y V4 del gen *16S rRNA*. La base de datos entrenada fue eHOMD 15.2 al 99% de identidad [131]. Se filtró la tabla de ASV para eliminar los ASV que no estaban presentes en al menos dos muestras con q2-feature-table [132]. Después, la rarefacción de todas las muestras a una profundidad mínima de 10,000 secuencias por muestra usando q2-feature-table rarefy (figura 7); se realizaron las métricas de diversidad alfa (especies observadas, Chao1, Shannon y Simpson), la métrica de diversidad beta (disimilitud de Bray-Curtis) y el análisis de coordenados principales utilizando la q2-diversity para los grupos con y sin caries [132].

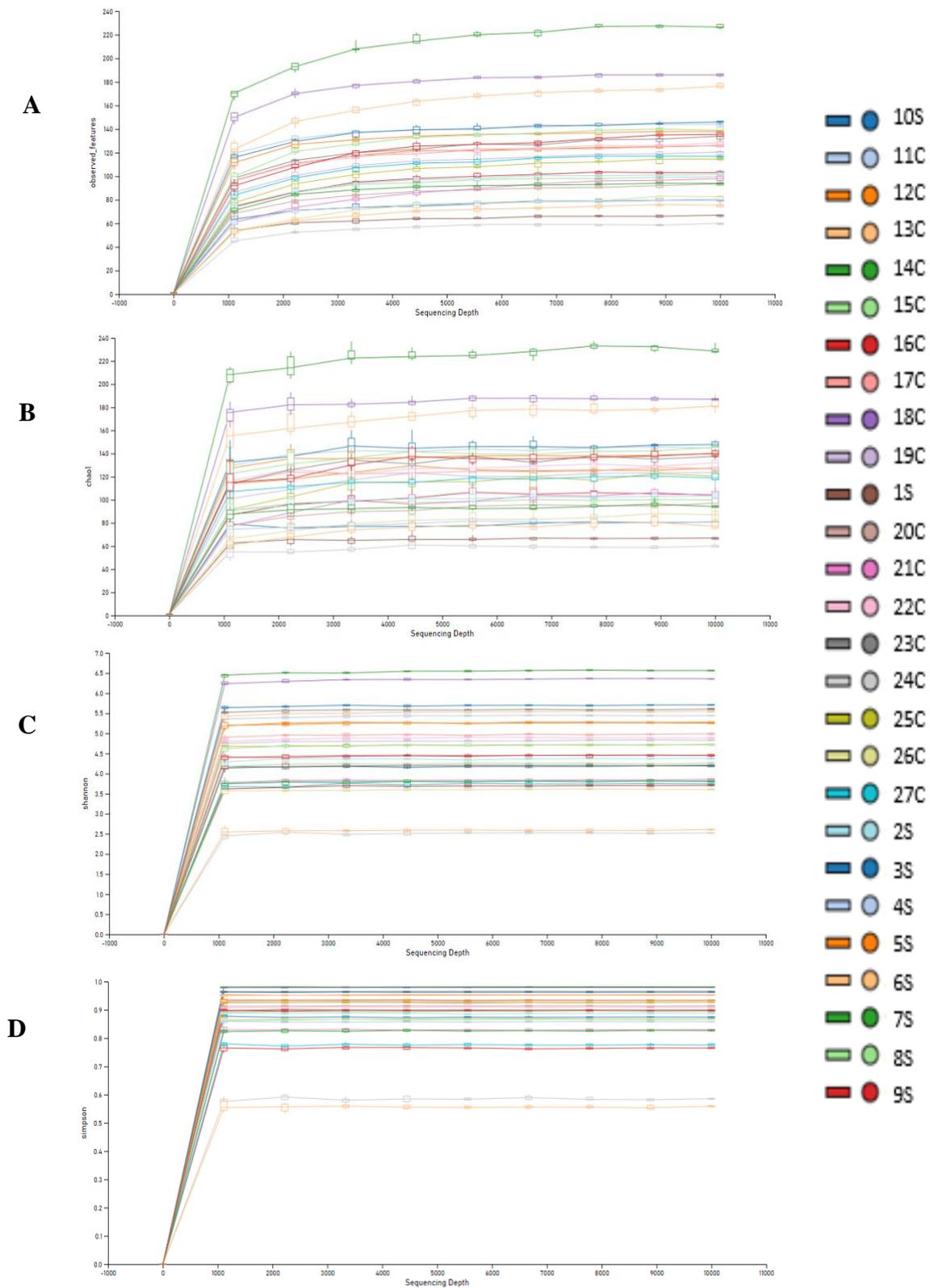


Figura 7. Rarefacción de las variantes de secuencia por amplicon (ASV).

Se muestran curvas de acumulación: A) basadas en las especies observadas; B) ajustado al estimador de riqueza Chao1; C) basado en el índice de diversidad de Shannon; D) basado en el índice de diversidad de Simpson. La letra S se refiere a muestras tomadas de la placa supragingival de dientes no cariosos; la letra C se refiere a las muestras tomadas del tejido dentina infectada por caries.

## *Análisis estadístico*

Los datos fueron procesados con el Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versión v21), GraphPad Prism v8 (La Jolla, CA, EUA) y RStudio 3.6.3. La distribución normal de los valores de los datos demográficos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk. Si se confirmaba el supuesto de normalidad, se utilizaba la prueba paramétrica no pareada de *t*-Student para muestras independientes, asumiendo varianzas iguales. Si no se confirmaba el supuesto de normalidad, se aplicaba la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos no pareados. El análisis de correlación entre la expresión de las citocinas y la diversidad de la microbiota oral con y sin caries se llevó a cabo con la prueba de *Spearman* con corrección de comparaciones múltiples por el método FDR (por sus siglas en inglés, false discovery rate) para ajustar el valor de *p* para correlaciones múltiples. Para los datos nominales y dicotómicos, sexo e historia de caries, se aplicó una prueba de chi cuadrado, de lo contrario, se aplicó la prueba exacta de Fisher para variables con valores esperados < 5. La AR a nivel de phylum y género se reportó en frecuencias. La expresión de citocinas se reportó en veces de incremento por el método de DDCT. Para medir la diversidad y riqueza de los taxones microbianos de la población de estudio y entre grupos, se usaron las métricas de diversidad alfa y beta, respectivamente. Para la comparación del grupo libre de caries y con caries se aplicó la prueba *U* de Mann-Whitney. Además, para identificar taxones biológicos con características discriminantes entre ambos grupos, se aplicó un análisis de discriminación lineal (por sus siglas en inglés Linear Discriminant Analysis [LDA] Effect Size, LEfSe) utilizando los parámetros previamente establecidos por la plataforma [133]. Para la métrica de diversidad beta se aplicó el estimado de disimilitud de Bray-Curtis y el análisis para distancia de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA). La significancia estadística fue considerada en  $p \leq 0.05$ .

## Resultados

### *Sujetos de estudio*

El estudio incluyó 31 sujetos quienes donaron 31 dientes. Los sujetos fueron 20 (64.5%) mujeres y 11 (35.5%) hombres, con edad promedio de  $28.5 \pm 5.6$  años. Los sujetos incluidos fueron clasificados, de acuerdo con la presencia de caries, en dos grupos: 14 (45.2%) libres de caries o con antecedentes de caries inactivas (no-caries) y 17 (54.8%) caries activa (caries). Dos (6.5%) individuos tenían antecedentes de nunca haber tenido caries (libre de caries), 12 (38.7%) tenían antecedentes de caries (caries inactivas) y 17 (54.8%) presentaron caries activa. Cuando se hicieron comparaciones entre los dos grupos de estudio, no se observó diferencia significativa en cuanto al sexo y la edad, sin embargo, se observó una diferencia en caries moderada ( $p < 0.001$ ). Las características demográficas de los sujetos del estudio se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Características demográficas de los participantes del estudio

	No-caries	Caries	Total	<i>p</i>
<b>Muestra</b>	14 (45.2)	17 (54.8)	31 (100)	
<b>Sexo</b> <sup>b</sup>				0.258
Mujer	11 (35.5)	9 (29.0)	20 (64.5)	
Hombre	3 (9.7)	8 (25.8)	11 (35.5)	
<b>Edad, años</b> <sup>a</sup>				0.210
17 - 22	3 (9.7)	2 (5.9)	5 (15.5)	
23 - 27	4 (12.9)	3 (9.7)	7 (22.6)	
27 - 32	5 (16.1)	5 (16.1)	10 (32.2)	
33 - 37	2 (6.5)	6 (19.4)	8 (25.9)	
38 - 43		1 (3.2)	1 (3.2)	
	27.1 ± 4.9	29.7 ± 6.0	28.5 ± 5.6	
	27.5 [9.8]	29.0 [6.5]	28.0 [8.0]	
<b>Historia de caries</b> <sup>b</sup>				< 0.001***
Libre	2 (6.5)		2 (6.5)	
Inactiva	12 (38.7)		12 (38.7)	
Activa		17 (54.8)	17 (54.8)	

Notas. Los datos se reportan en número y porcentaje n (%); así como en media ± desviación estándar, o como la mediana y el rango intercuartilar [RIC].

<sup>a</sup> Prueba t de Student paramétrica no pareada para muestras independientes asumiendo varianzas iguales.

<sup>b</sup> Para las variables nominales y dicotómicas con valores esperados < 5, se aplicó la prueba exacta de Fisher.

La significancia estadística fue considerada al 95% de confianza, con un valor de  $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### ***Microbiota oral asociada a caries moderada de dentina***

Cuatro muestras de DNA del grupo sin caries no cumplieron con los criterios de calidad solicitados por Macrogen Co. Por lo que fueron eliminadas del estudio y no fueron secuenciadas. Para el análisis de microbioma se secuenciaron 27 muestras. Se obtuvieron un total de 2,515,688 secuencias crudas a partir de DNA aislado de PDB supragingival (n = 10) y TD cariado (n = 17), con una media de 931,736 secuencias por muestra. Después del control de calidad, se mantuvieron un total de 1,035,182 secuencias con una media de 38,340 secuencias por muestra.

Como se muestra en la Figura 8, la disimilitud de las comunidades bacterianas entre sanos vs enfermos se visualizó mediante el análisis de coordinados principales (PCoA). El análisis PERMANOVA mostró que hay una diferenciación significativa del 39.9% entre no caries versus caries ( $R^2 = 0.399$ ;  $p = 0.001$ ). Las métricas de diversidad alfa no mostraron diferencias significativas en la abundancia y riqueza del microbioma oral de los sujetos libres de caries y con caries (Figura 9). El análisis LEfSe no reveló ningún género discriminante entre los grupos de no caries y caries.

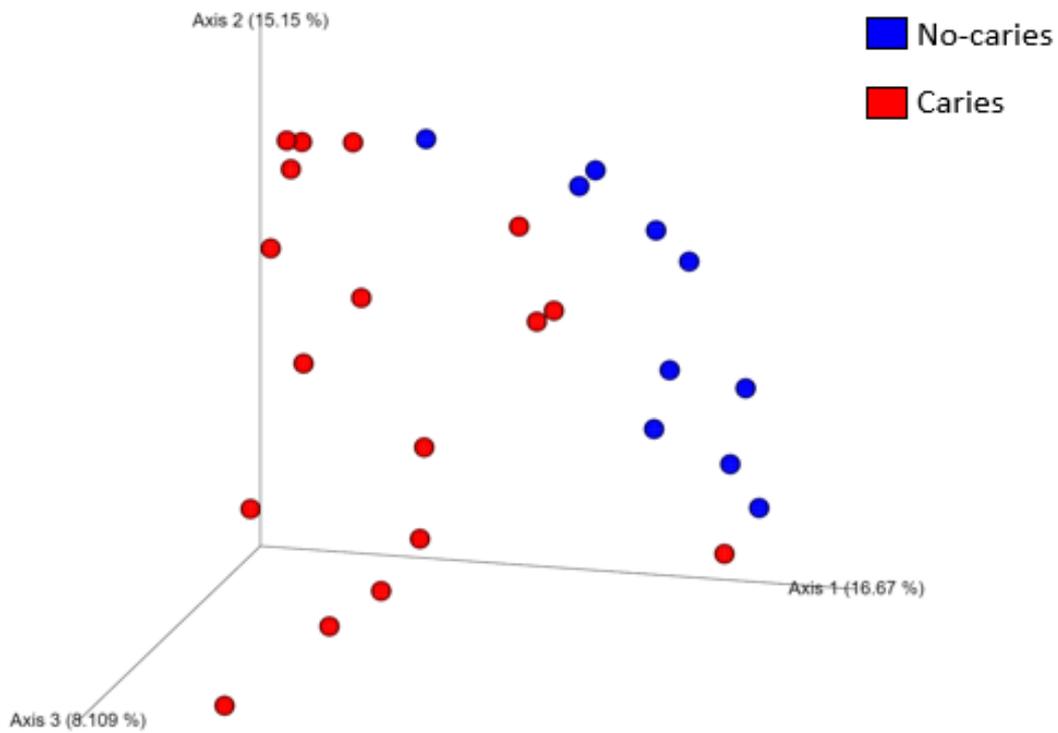


Figura 8. Análisis de beta diversidad de los dos grupos: sin caries y con caries

Las comunidades bacterianas se visualizaron mediante análisis de coordenados principales (PCoA) utilizando el índice de disimilitud de Bray-Curtis. Se utilizó el análisis multivariado permutacional de varianza (PERMANOVA) para evaluar las diferencias entre los dos grupos (PERMANOVA;  $p=0.001$ ). Los puntos azules refieren al grupo sin caries y los puntos rojos se refieren al grupo con caries.

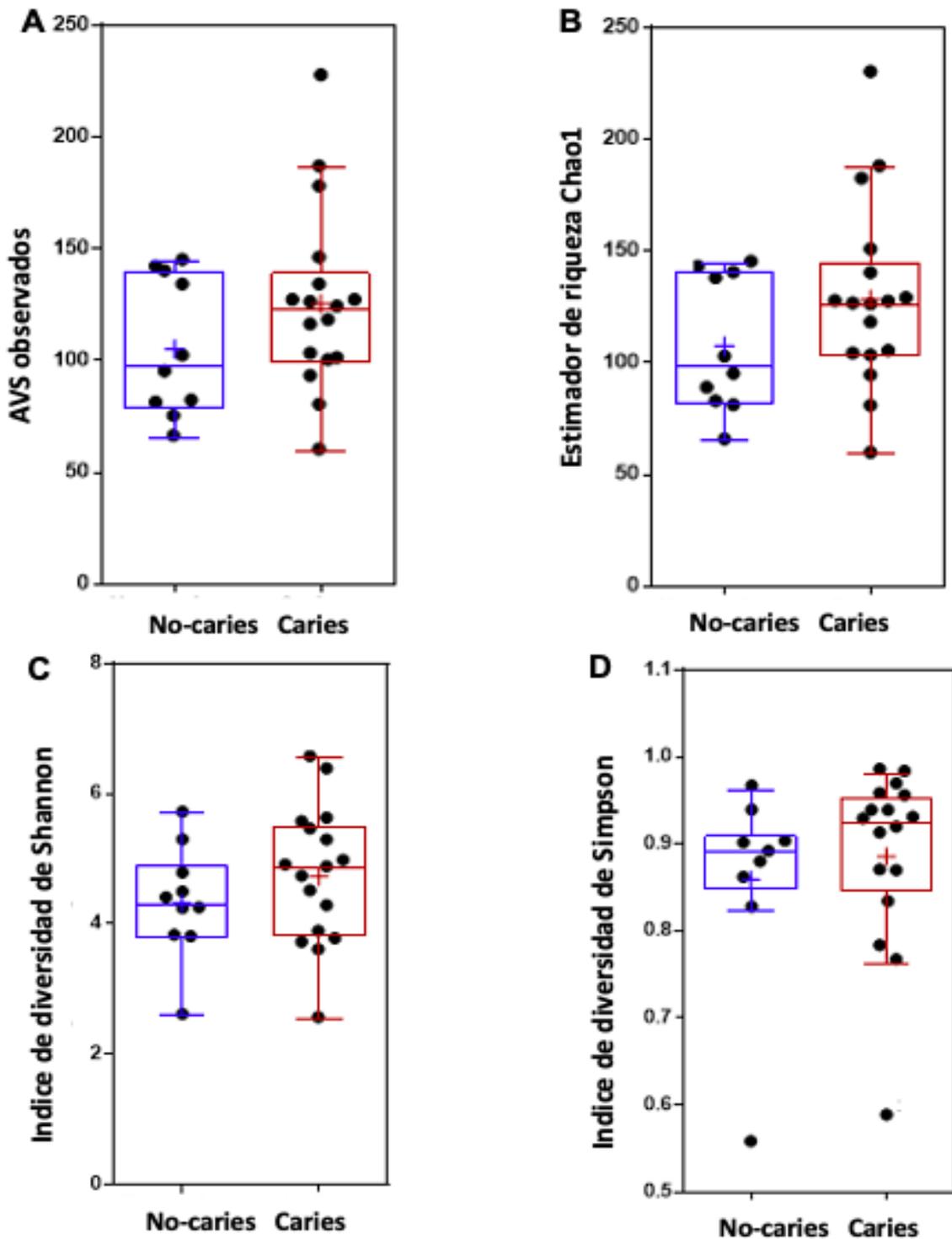


Figura 9. El análisis de la alpha diversidad.

A) ASV observados ( $Me = 97.50$  vs  $Me = 123.0$ ,  $p = 0.34$ ); B) estimador de riqueza chao1 ( $Me = 98.13$  vs  $Me = 125.8$ ,  $p = 0.30$ ); C) Índice de diversidad de Shannon ( $Me = 4.30$  vs  $Me = 4.85$ ,  $p = 0.35$ ); D) Índice de diversidad de Simpson ( $Me = 0.89$  vs  $Me = 0.92$ ,  $p = 0.28$ ). Los datos se muestran de la siguiente manera: una línea sólida horizontal dentro del cuadro representa la mediana; la posición de la cruz (+) denota el promedio; el recuadro abarca los resultados dentro del 25-75% de los datos (rango intercuartílico); los bigotes representan los valores del 5-95%, normalizados de acuerdo con las bisagras de Tukey; los puntos negros (\*) representan cada muestra. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney, considerando significación a  $p \leq 0.05$ .

El microbioma oral de la PDB y el TD cariado examinado en este estudio están compuestos por 11 phyla. En general, los 5 principales phyla fueron *Firmicutes* (55,99%), *Actinobacteria* (14.28%), *Proteobacteria* (10.05%), *Bacteroidetes* (9.21%) y *Fusobacteria* (8.68%), que representan el 98,21% de la abundancia total. Se observó un aumento significativo en el phylum *Actinobacteria* al comparar dientes con caries versus sin caries ( $p < 0.001$ ), (Tabla 11 y figura 10).

A nivel de género, en todos los sujetos de estudio, la AR del MB oral está representada por 101 géneros bacterianos, de los cuales 20 géneros representan el 88.89% de la abundancia total. Los 5 géneros principales fueron *Veillonella* spp. (21.94%), *Streptococcus* spp. (19.21%), *Lactobacillus* spp. (6.33%), *Actinomyces* spp. (5.83%) y *Leptotrichia* spp. (5.78 %). Un aumento significativo en la AR de *Lactobacillus* spp. ( $p = 0.012$ ), *Actinomyces* spp. ( $p = 0.004$ ), *Prevotella* spp. ( $p = 0.031$ ), *Mitsuokella* spp. ( $p = 0.015$ ), *Campylobacter* spp. ( $p = 0.007$ ), *Selenomonas* spp. ( $p = 0.001$ ), y se observaron *scardovia* spp. ( $p = 0.038$ ) en dientes cariados. Por el contrario, la AR de *Haemophilus* spp. ( $p = 0.008$ ) y *Porphyromonas* spp. ( $p = 0.016$ ) disminuyó en el grupo con caries. Adicionalmente, *Olsenella* spp. ( $p < 0.001$ ) y *Parascardovia* spp. ( $p = 0.002$ ) se observaron, exclusivamente, en caries moderada de dentina (Tabla 8 y figura 11).

Tabla 7. Abundancia relativa a nivel de phyla

<b>Phyla</b>	<b>Total</b>	<b>No-caries</b>	<b>Caries</b>	<b>p</b>
<i>Firmicutes</i> spp. <sup>a</sup>	55.99	62.57	53.38	0.245
<i>Actinobacteria</i> spp. <sup>b</sup>	14.28	4.48	18.17	0.001***
<i>Proteobacteria</i> spp. <sup>b</sup>	10.05	12.63	9.03	0.547
<i>Bacteroidetes</i> spp. <sup>b</sup>	9.21	9.15	9.23	0.228
<i>Fusobacteria</i> spp. <sup>b</sup>	8.68	10.62	7.91	0.725
<i>Saccharibacteria_(TM7)</i> <sup>b</sup>	0.91	0.44	1.10	0.353
<i>p__unclassified</i> <sup>b</sup>	0.37	0.00	0.51	0.110
<i>Spirochaetes</i> spp. <sup>b</sup>	0.31	0.05	0.41	0.210
<i>Synergistetes</i> spp. <sup>b</sup>	0.12	0.01	0.17	0.271
<i>Abscondibacteria_(SR1)</i> <sup>b</sup>	0.06	0.05	0.06	0.836
<i>Chloroflexi</i> spp. <sup>b</sup>	0.02	0.00	0.03	0.104

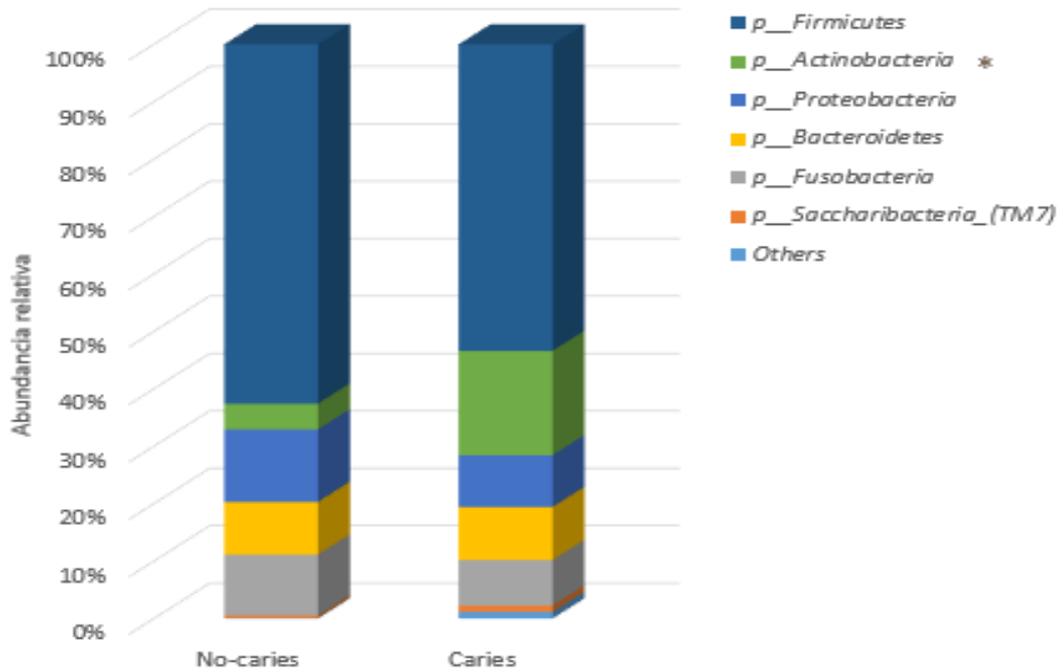
Nota. Los datos se expresan como un porcentaje.

<sup>a</sup> Se aplicó la prueba t paramétrica de Student para los datos normales, asumiendo varianzas desiguales.

<sup>b</sup> Cuando los datos no cumplían con los supuestos de normalidad, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para muestras independientes.

La significancia estadística fue considerada al 95% de confianza, con un valor de  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

A



B

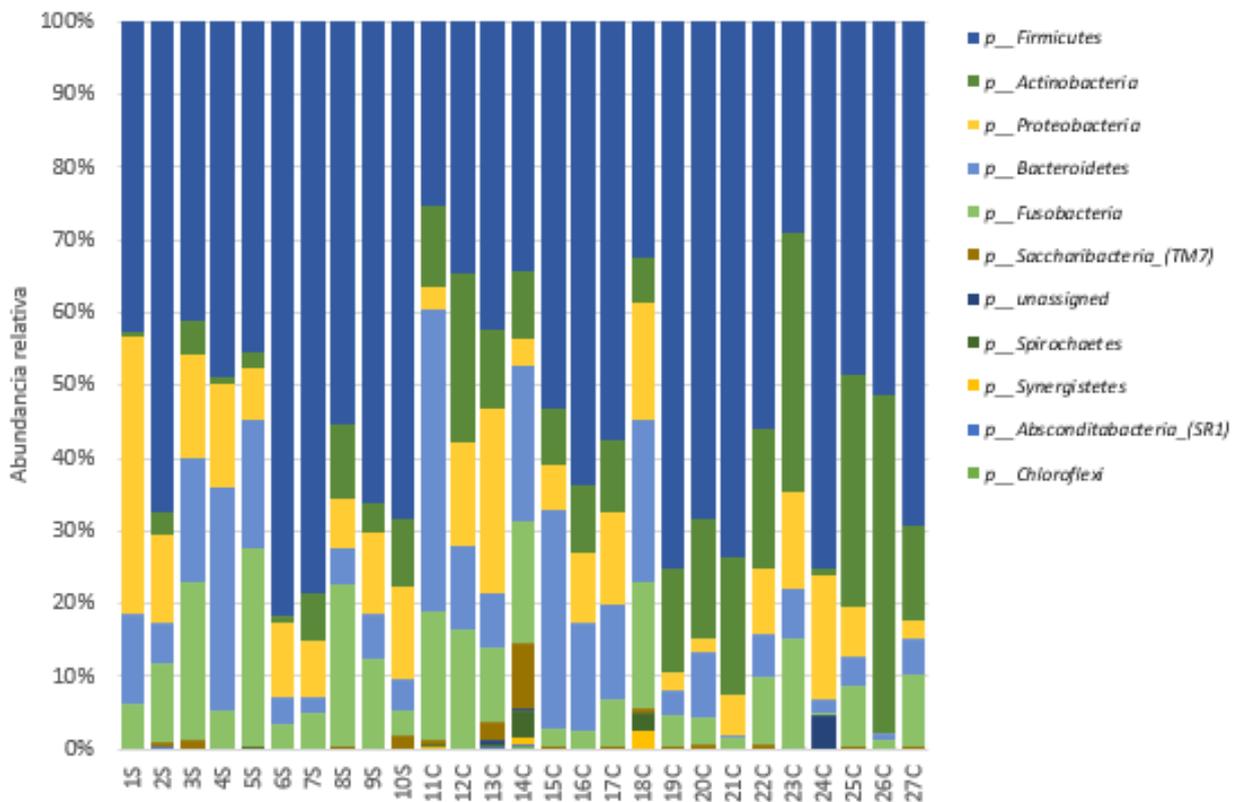


Figura 10. Abundancia relativa por phyla en la microbiota oral.

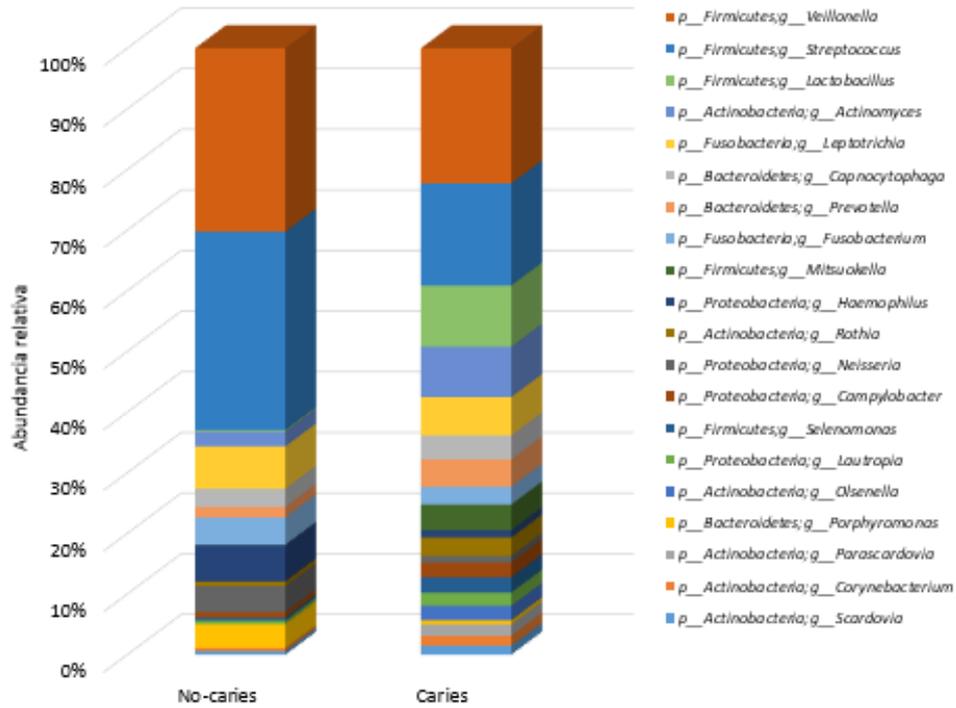
Barplots taxonómicos que muestran los 11 phyla encontrados en la microbiota oral A) estratificados por grupo: dientes sin caries y con caries B) de todos. La letra S se refiere a las muestras tomadas

Tabla 8. Abundancia relativa a nivel de género.

<b>Géneros</b>	<b>Total</b>	<b>No-caries</b>	<b>Caries</b>	<b>p</b>
<i>p__Firmicutes;g__Veillonella</i>	21.94	28.08	19.10	0.482
<i>p__Firmicutes;g__Streptococcus</i>	19.21	30.40	14.42	0.120
<i>p__Firmicutes;g__Lactobacillus</i>	6.33	0.23	8.63	0.012*
<i>p__Actinobacteria;g__Actinomyces</i>	5.83	2.28	7.13	0.004**
<i>p__Fusobacteria;g__Leptotrichia</i>	5.78	6.46	5.41	0.880
<i>p__Bacteroidetes;g__Capnocytophaga</i>	3.27	2.81	3.39	0.451
<i>p__Bacteroidetes;g__Prevotella</i>	3.27	1.61	3.86	0.031*
<i>p__Fusobacteria;g__Fusobacterium</i>	3.02	4.16	2.51	0.422
<i>p__Firmicutes;g__Mitsuokella</i>	2.65	0.05	3.63	0.015*
<i>p__Proteobacteria;g__Haemophilus</i>	2.36	5.60	1.03	0.008**
<i>p__Actinobacteria;g__Rothia</i>	2.09	0.69	2.61	0.120
<i>p__Proteobacteria;g__Neisseria</i>	1.82	4.01	0.92	0.071
<i>p__Proteobacteria;g__Campylobacter</i>	1.73	0.81	2.07	0.007**
<i>p__Firmicutes;g__Selenomonas</i>	1.72	0.46	2.19	0.001**
<i>p__Proteobacteria;g__Lautropia</i>	1.50	0.53	1.86	0.498
<i>p__Actinobacteria;g__Olsenella</i>	1.49	0.00	2.05	< 0.001***
<i>p__Bacteroidetes;g__Porphyromonas</i>	1.46	3.67	0.56	0.016*
<i>p__Actinobacteria;g__Parascardovia</i>	1.18	0.00	1.62	0.002**
<i>p__Actinobacteria;g__Corynebacterium</i>	1.15	0.48	1.39	0.144
<i>p__Actinobacteria;g__Scardovia</i>	1.09	0.55	1.28	0.038*

Nota. Los datos se expresan como en porcentaje. Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para muestras independientes. La significancia estadística se consideró con un 95% de confianza, con un valor de  $*p \leq 0.05$ . Se indican otros valores p:  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ .

**A**



**B**

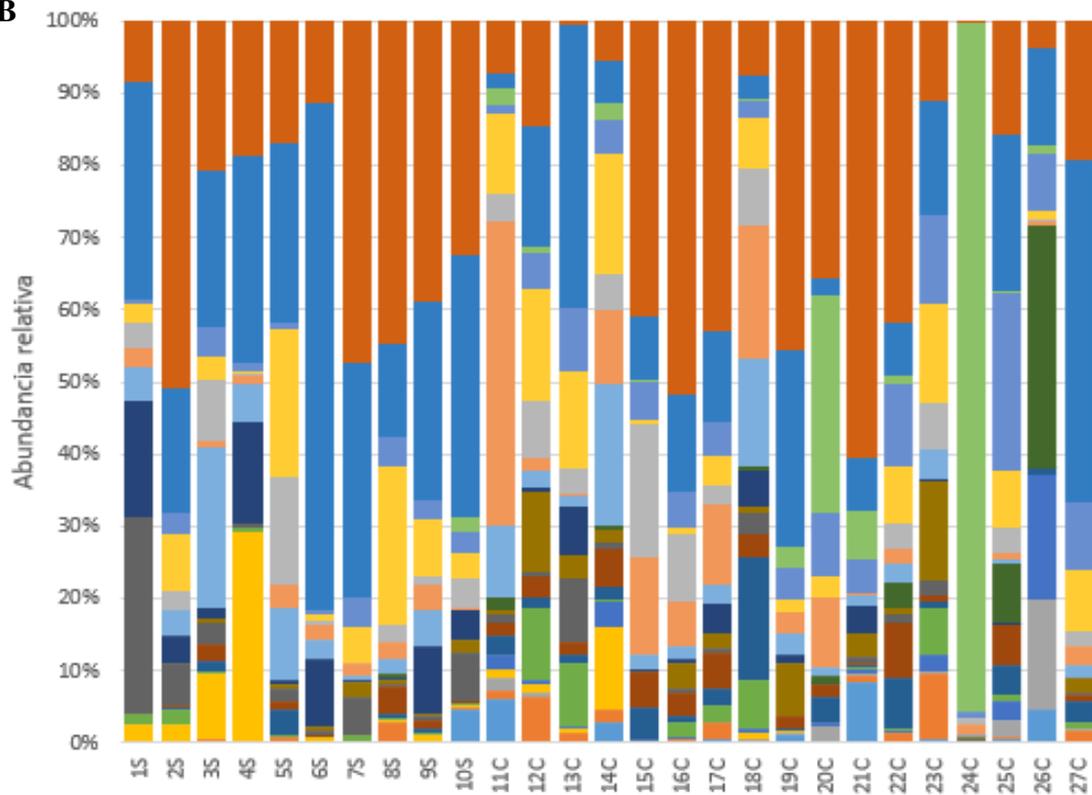


Figura 11 Abundancia relativa por género en la microbiota oral.

Barplots taxonómicos que muestran los 20 géneros encontrados en la microbiota oral A) estratificados por grupo: dientes sin caries y con caries B) de todos. La letra S se refiere a las muestras de placa dentobacteriana supragingival de los dientes sin caries; la letra C se refiere a las muestras tomadas del tejido dentina infectado por caries.

## Respuesta inmune innata del tejido pulpar dental expuesto a caries moderada de dentina

A continuación, evaluamos la expresión de varios marcadores de RII del tejido pulpar de dientes no cariados y cariados ( $n = 14$  y  $n = 17$ , respectivamente) mediante RT-PCR. Dos citocinas proinflamatorias: IL1 $\beta$  ( $p < 0.0001$ ), IL6 ( $p = 0.041$ ) y una quimiocina CXCL8 ( $p = 0.041$ ) estaban significativamente elevadas en dientes cariados en comparación con dientes no carios. No se observaron diferencias para todos los demás marcadores (TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL10 y TGF $\beta$ ), (figura 12).

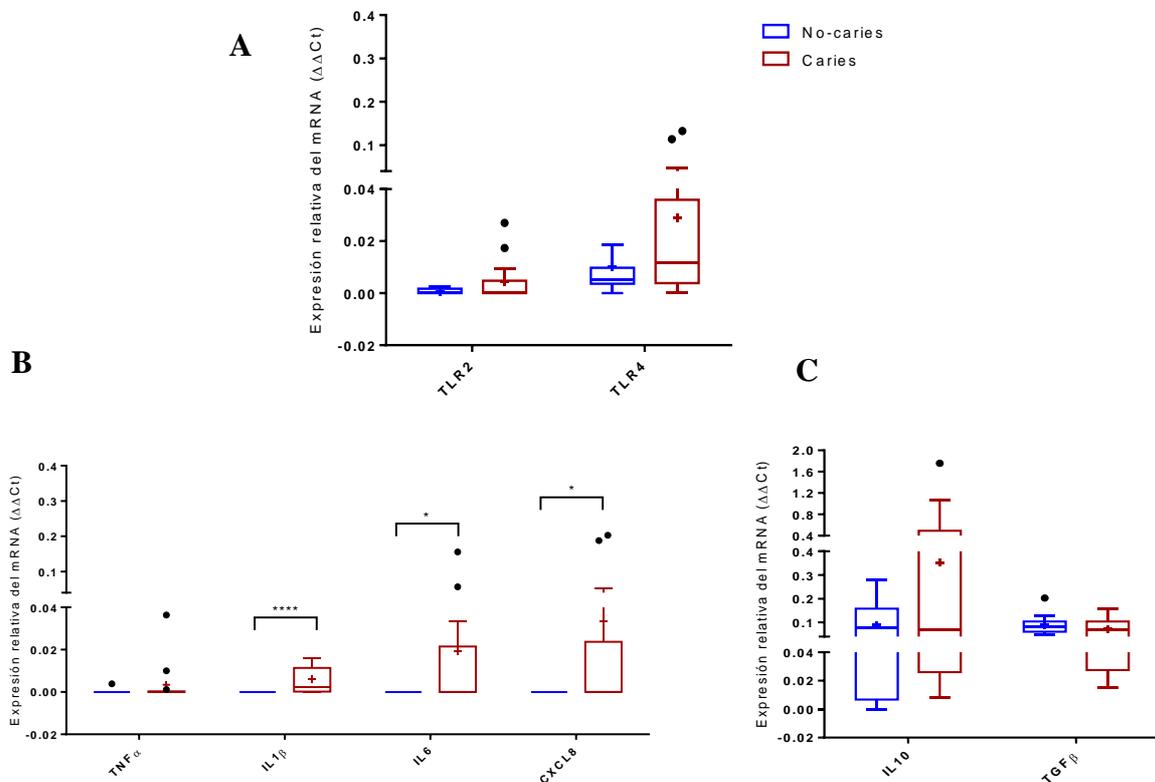


Figura 12. Expresión de receptores tipo Toll (TLR) y marcadores inflamatorios en tejido pulpar dental no expuesto y expuesto a caries.

A) Amplificación de TLR2 y TLR4. B) Amplificación de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 y CXCL8 (IL8) (tres citocinas proinflamatorias y una quimiocina, respectivamente); C) Amplificación de IL10 y TGF $\beta$  (citocinas reguladoras). Los datos se muestran de la siguiente manera: la línea sólida horizontal dentro del cuadro representa la mediana; la posición de la cruz (+) denota el promedio; el recuadro ilustra los resultados dentro de los percentiles 25-75 (rango intercuartilar); los bigotes representan valores del 5 al 95% normalizados según la prueba de Tukey; los puntos negros (•) muestran valores atípicos. Análisis estadístico mediante la prueba U de Mann-Whitney, considerando una significancia de  $p < 0.05$  (\* $p = 0.0407$  y \*\*\* $p = 0.0001$ ).

**Correlación entre la microbiota oral cariogénica y los marcadores inflamatorios de la respuesta inmune innata del tejido pulpar dental**

Al explorar las relaciones intermicrobianas entre los 20 principales géneros reportados para ambos grupos, con y sin caries; el análisis de coordenados principales (PCoA) mostró que los géneros bacterianos de la MB oral pueden formar grupos cuya diferenciación es explicada en un 54.78% ( $R^2 = 0.5478$ ;  $p > 0.05$ ): a) *Mitsuokella* spp., *Parascardovia* spp., *Olsenella* spp. y *Porphyromonas* spp.; b) *Selenomonas* spp., *Campylobacter* spp., *Actinomyces* spp. y *Streptococcus* spp.; y *Lautropia* spp., *Rothia* spp. y *Corynebacterium* spp. (Figura 13).

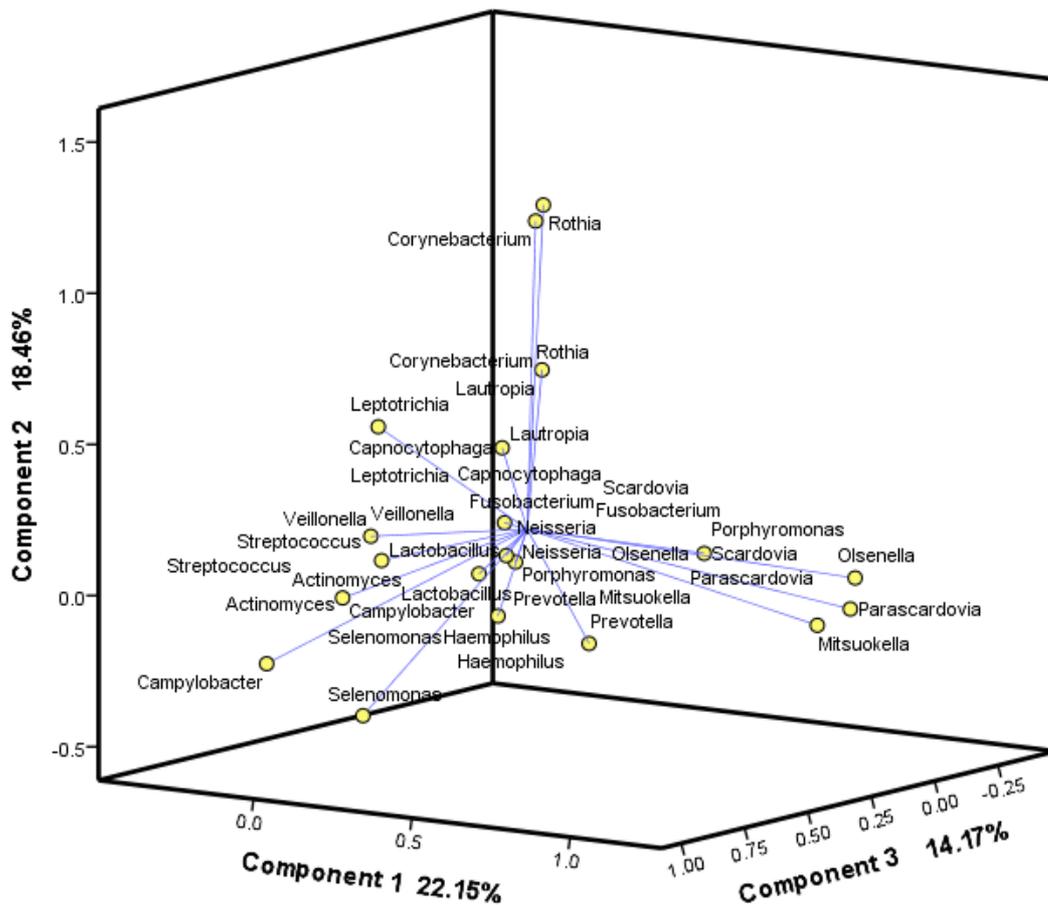


Figura 13. Matriz de tipo PCA biplot. Varianza explicada en un 55 % ( $R^2 = 0.5478$ ;  $p > 0.05$ ).

Después, al explorar la expresión de todos los marcadores inflamatorios como un factor de variabilidad de la MB oral de acuerdo con el estado de salud dental, se pudo observar que los sujetos del grupo sin caries se agrupaban en un cluster y además se distanciaban de los sujetos con caries; mientras que los sujetos con caries se vieron influenciados por cada uno de los marcadores inflamatorios pulpares, con una variabilidad explicada en un 54% ( $R^2 = 0.5399$ ;  $p > 0.05$ ), (Figura 14).

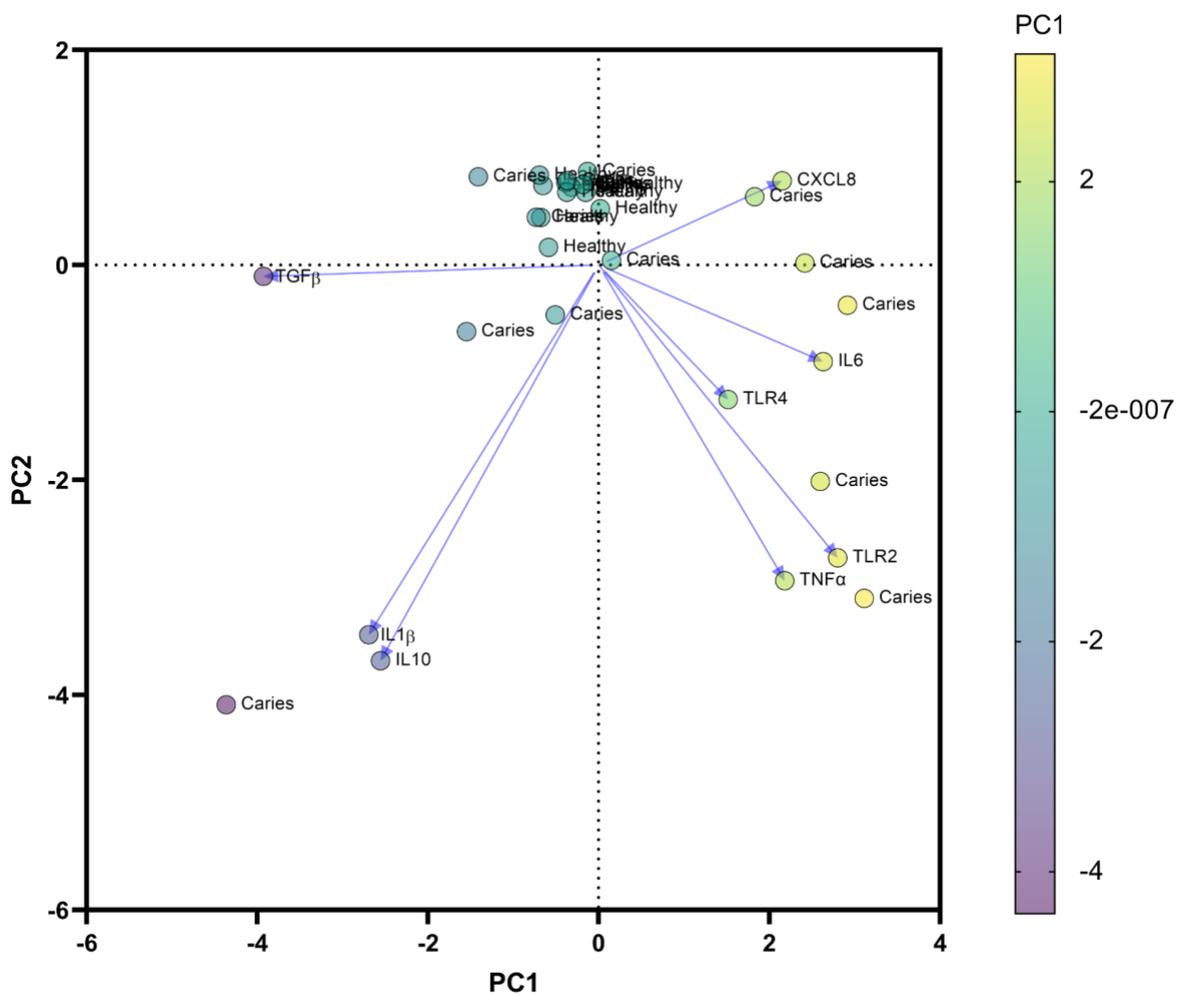


Figura 14. Asociación por biplot de análisis de componentes principales (PCA) de marcadores inflamatorios del tejido pulpar dental expuesto y no expuesto a caries, demostrando grupos de muestras con base en su similitud (gráfico de puntuación de PCA) y con qué fuerza cada característica (barra vertical derecha tipo headmap: amarillo, verde, morado) influye en un componente principal (PC1 y PC2). Un total de 54% ( $R^2 = 0.5399$ ;  $p > 0.05$ ) de variación en los sujetos con y sin caries de acuerdo a la expresión de todos los marcadores inflamatorios.

Como se muestra en las Figuras 15, los análisis de correlación múltiple permitieron observar varias asociaciones positivas y negativas y a continuación se resumen algunas de ellas. *Lactobacillus* correlacionó positivamente con *Scardovia* ( $R^2 = 0.20$ ,  $p = 0.019$ ), *Olsenella* ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.023$ ), *Parascardovia* ( $R^2 = 0.18$ ,  $p = 0.029$ ) y *Mitsuokella* ( $R^2 = 0.28$ ,  $p = 0.005$ ), y negativamente con *Haemophilus* ( $R^2 = 0.23$ ,  $p = 0.011$ ), *Neisseria* ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.024$ ) y *Lautropia* ( $R^2 = 0.03$ ,  $p = 0.016$ ). Del mismo modo, *Actinomyces* se correlacionó positivamente con *Leptotrichia* ( $R^2 = 0.38$ ,  $p = 0.048$ ), *Corynebacterium* ( $R^2 = 0.26$ ,  $p = 0.006$ ) y *Campylobacter* ( $R^2 = 0.03$ ,  $p = 0.003$ ); y negativamente con *Porphyromonas* ( $R^2 = 0.20$ ,  $p = 0.018$ ) y *Fusobacterium* ( $R^2 = 0.15$ ,  $p = 0.047$ ). *Prevotella* se correlacionó positivamente con *Campylobacter* ( $R^2 = 0.003$ ,  $p = 0.019$ ) y *Selenomonas* ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.024$ ); y negativamente con *Haemophilus* ( $R^2 = 0.16$ ,  $p = 0.038$ ) y *Neisseria* ( $R^2 = 0.20$ ,  $p = 0.017$ ). *Mitsuokella* se correlacionó positivamente con *Campylobacter* ( $R^2 = 0.15$ ,  $p = 0.046$ ), *Selenomonas* ( $R^2 = 0.25$ ,  $p = 0.007$ ), *Olsenella* ( $R^2 = 0.34$ ,  $p = 0.002$ ) y *Parascardovia* ( $R^2 = 0.26$ ,  $p = 0.007$ ); y negativamente con *Haemophilus* ( $R^2 = 0.44$ ,  $p < 0.001$ ) y *Neisseria* ( $R^2 = 0.21$ ,  $p = 0.016$ ). *Campylobacter* se correlacionó positivamente con *Corynebacterium* ( $R^2 = 0.35$ ,  $p = 0.001$ ). *Selenomonas* se correlacionó positivamente con *Corynebacterium* ( $R^2 = 0.16$ ,  $p = 0.04$ ) y *Campylobacter* ( $R^2 = 0.76$ ,  $p = 0.01$ ), y negativamente con *Porphyromonas* ( $R^2 = 0.20$ ,  $p = 0.019$ ). *Olsenella* se correlacionó positivamente con *Scardovia* ( $R^2 = 0.44$ ,  $p = 0.012$ ). *Haemophilus* se correlacionó positivamente con *Streptococcus* ( $R^2 = 0.23$ ,  $p = 0.012$ ). *Porphyromonas* se correlacionó positivamente con *Haemophilus* ( $R^2 = 0.24$ ,  $p = 0.01$ ), *Fusobacterium* ( $R^2 = 0.33$ ,  $p = 0.05$ ) y *Neisseria* ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.022$ ).

Después, se evaluaron las relaciones dentro de la RII. TLR2 se correlacionó positivamente con IL1  $\beta$  ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.025$ ), IL6 ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.001$ ) y negativamente con TGF $\beta$  ( $R^2 = 0.19$ ,  $p = 0.013$ ). Además, la expresión de IL1 $\beta$  correlacionó positivamente con IL10 ( $R^2 = 0.18$ ,  $p = 0.040$ ) e IL6 ( $R^2 = 0.41$ ,  $p < 0.001$ ). IL6 se correlacionó positivamente con CXCL8 ( $R^2 = 0.58$ ,  $p < 0.001$ ) y TNF $\alpha$  ( $R^2 = 0.28$ ,  $p = 0.088$ ); y mientras se correlaciona negativamente con TGF $\beta$  ( $R^2 = 0.45$ ,  $p < 0.001$ ). CXCL8 se correlacionó negativamente con TGF $\beta$  ( $R^2 = 0.30$ ,  $p < 0.001$ ). Finalmente, se evaluaron las relaciones entre los géneros asociados a caries y la RII; y se observó que IL1 $\beta$  correlaciona positivamente con *Actinomyces* ( $R^2 = 0.37$ ,  $p = 0.046$ ), y negativamente *Porphyromonas* ( $R^2 = 0.38$ ,  $p = 0.042$ ).

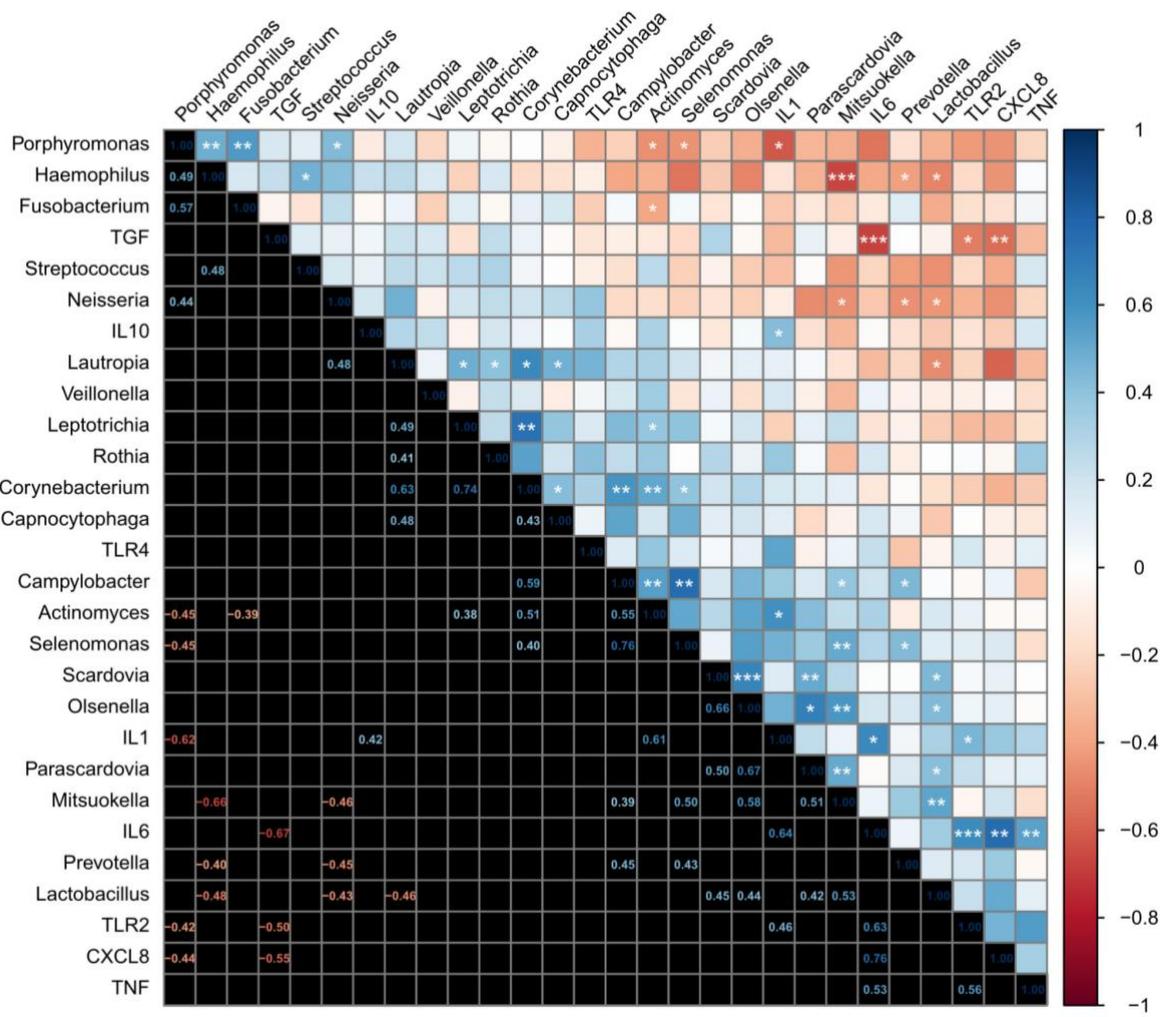


Figura 15. Análisis de la correlación entre la microbiota bacteriana cariogénica y la expresión de los marcadores inflamatorios del tejido pulpar dental.

Las correlaciones se muestran como un mapa de calor. Después de someter los datos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, los resultados requirieron la aplicación de la correlación no paramétrica de Spearman. La significancia estadística se consideró en el 95% de la confianza, con un valor de  $*p \leq 0.05$ . Se indican otros valores  $p$ :  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ .

La Figura 16 ilustra los principales hallazgos de este estudio: un modelo *ex-vivo* de caries en progresión libre mostró que durante el curso natural de la enfermedad, el TPD expuesto a la MB oral asociada con una etapa moderada de caries dentina, sobre-expresó citocinas proinflamatorias inmunes innatas IL1 $\beta$ , IL6 y quimiocina CXCL8, contribuyendo así a una etapa de inflamación impulsada por la expresión de TLRs y desencadenada por diferentes MAMP de grampositivos y bacterias gramnegativas asociadas con caries moderada de dentina.

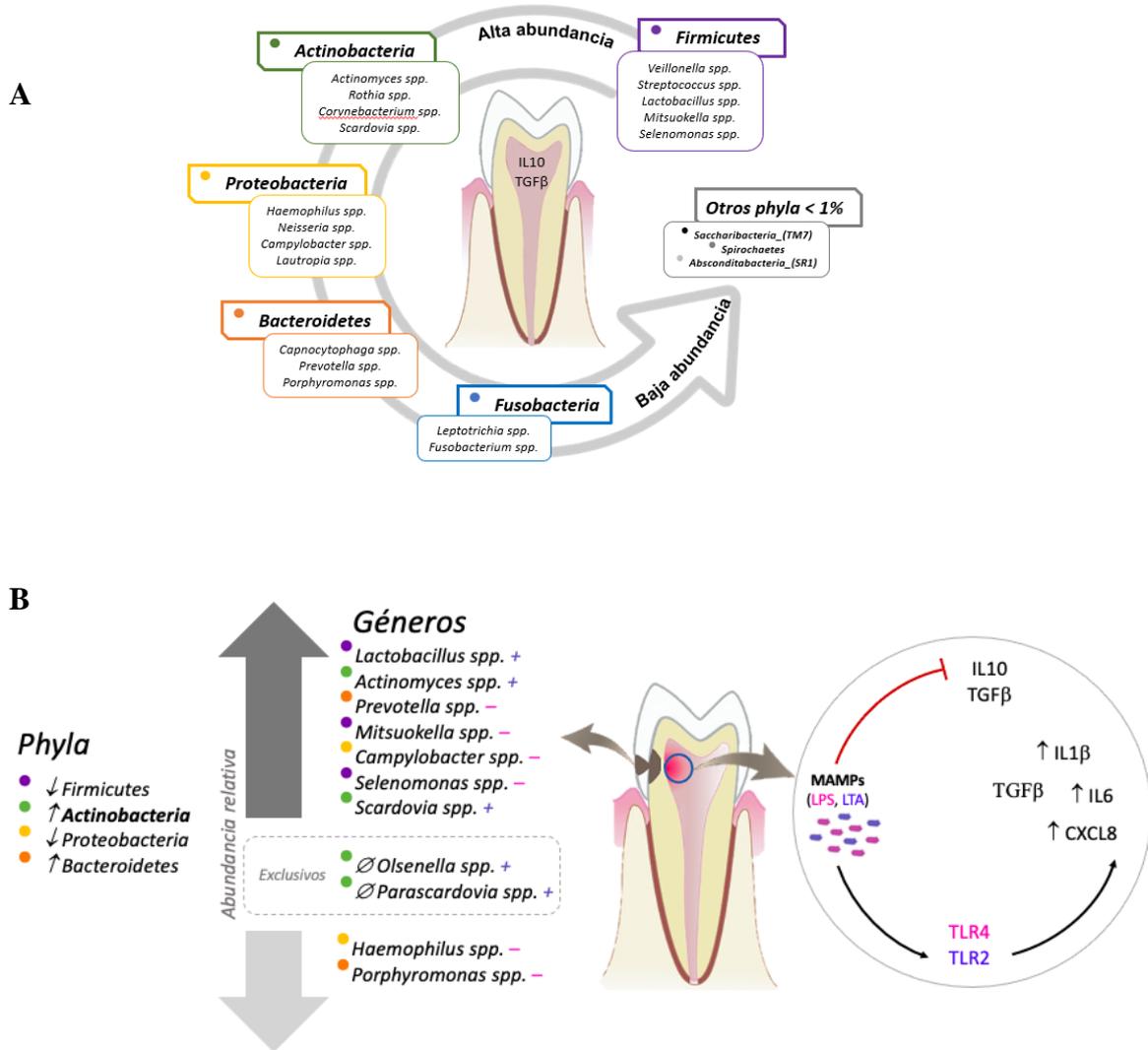


Figura 16. Resumen gráfico de la asociación de la microbiota bacteriana cariogénica y la respuesta inmune innata del tejido pulpar dental.

A) El microbioma de placa dentobacteriana (PDB) de dientes libres de caries está representado en un 99.12% y 88.89% por seis phyla y sus 20 géneros, respectivamente. En presencia de estos perfiles bacterianos, el tejido pulpar dental expresa constitutivamente las citocinas reguladoras IL10 y TGFβ. B) La microbiota caries moderada de dentina refleja un incremento en los perfiles taxonómicos de Firmicutes\_Lactobacillus sp., Actinobacteria\_Actinomyces sp., Bacteroidetes\_Prevotella sp., Firmicutes\_Mitsuokella sp., Proteobacteria\_Campylobacter sp., Firmicutes\_Selenomonas sp., y Actinobacteria\_Scardovia sp., así como una disminución en Proteobacteria\_Haemophilus y Proteobacteria\_Porphyromonas sp. en comparación con la microbiota de PDB libre de caries. Además, Actinobacteria\_Olsenella sp. y Actinobacteria\_Parascardovia sp. están presentes exclusivamente en caries moderada de dentina. En cuanto a la respuesta inmune, el tejido pulpar expuesto a caries moderada de dentina sobre-expresa significativamente las citocinas IL1β e IL6, así como la quimiocina CXCL8. Cada punto circular indica un color asignado a un phylum. Los signos más (+) y menos (-) indican bacterias grampositivas y gramnegativas, respectivamente. Los dos géneros dentro del rectángulo dibujado con una línea punteada se encuentran exclusivamente en caries moderada de dentina. ↑ aumento; ↓ disminución; ∅ exclusivo en caries.

## Discusión

En este estudio, uno de los mayores aportes fue hacer una correlación entre la respuesta inmunitaria y la composición y estructura del MB en caries. Esta búsqueda de relaciones no estocásticas es un gran valor ya que no ha sido explorado antes. El modelo *in vivo* de caries moderada de dentina demuestra que existen ligeras diferencias en la composición bacteriana oral, a nivel de diversidad beta entre la MB libre de caries y con caries; Sin embargo, sorprendentemente, no se encontraron diferencias al usar análisis LEfSe. [134]

Particularmente, en presencia de caries moderada de dentina, existe un incremento significativo del phylum *Actinobacteria* y de los géneros *Lactobacillus* spp., *Actinomyces*, spp. *Prevotella* spp., *Mitsuokella* spp., *Selenomonas* spp. y *Scardovia* spp. Así como, una disminución de los géneros *Haemophilus* y *Porphyromonas*. Adicionalmente, *Olsenella* spp. y *Parascardovia* spp. se identificaron como dos géneros exclusivos en este grado de caries.

Además, observamos que la MB oral muestra relevantes interacciones inter específicas formando así diferentes clusters; donde la ausencia o presencia de caries es un factor determinante de estas interacciones. Es así como se presentan relaciones intermicrobianas interesantes como: la asociación positiva de *Lactobacillus* spp. con *Olsenella* spp., *Parascardovia* spp. (ambos exclusivos de caries) y *Mitsuokella*, spp. Además de la asociación negativa de *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp. y *Mitsuokella* spp. con *Haemophilus* spp. y *Neisseria* spp.; así como de *Actinomyces* spp. y *Selenomonas* spp. con *Porphyromonas* spp.

De manera paralela, el tejido pulpar expuesto crónicamente a este grado de caries presenta un perfil proinflamatorio caracterizado por una mayor expresión de IL1 $\beta$ , IL6 y CXCL8; el cual se correlaciona, positiva y negativamente, con el perfil taxonómico bacteriano de la caries moderada de dentina; en particular con *Actinomyces* spp. y *Porphyromonas* spp., respectivamente.

Así mismo, es relevante enfatizar que, además de este estudio; no se encontraron antecedentes donde se halla relacionado al género *Mitsuokella* spp. con caries moderada de dentina, sin embargo, se sabe que juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal y de manera particular, *Mitsuokella dentalis* ha sido aislado de conductos radiculares dentales [135], [119]

A nivel de alpha y beta diversidad de MB oral, nuestros hallazgos son similares a lo reportado por Wolff D. y cols. [24] quienes analizaron la MB de PDB supragingival de superficies libres de caries y dentina cariada en una población alemana. Ellos observaron que las muestras libres de caries tienen disimilitud de las muestras con caries. Sin embargo, el grupo asociado a caries se agrupaba de manera más dispersa; además, la diversidad de la MB libre de caries fue mucho mayor en comparación al grupo asociado a caries.

Así mismo, también discrepamos a nivel de abundancia relativa, con el estudio de Wolff D. y cols. [24] ya que ellos reportaron 39 OTU más abundantes en muestras de dentina cariada, incluyendo *Atopobium* spp. (14.9 log<sub>2</sub>FoldChange), *Lactobacillus casei* (11.6), *Acinetobacter* spp. (10.8), *Lactobacillus gasseri* (10.6), *Parascardovia denticolens* (10.5), *Olsenella profusa* (10.4), *Propionibacterium acidifaciens* (7.2) y *Streptococcus mutans* (5.2). Es interesante discutir que, aunque los sujetos y modelos de estudio para el análisis del microbioma oral de ambos estudios son altamente equiparables, existen diferencias metodológicas en los protocolos (p. ej. el muestreo, las regiones hipervariables del gen *16S rRNA* y el análisis de secuenciación genómica) y a nivel de poblaciones.

Concordamos también con Obata y cols. [136] ya que ellos reportaron un predominio de *Lactobacillus* spp. y *Prevotella* spp. en caries de dentina. Así mismo, los resultados, a nivel de MB salival en caries, reportados por Belstrøm y cols. [137] concuerdan con la disminución de *Porphyromonas* reportada en este estudio. Por otra parte, Zheng y cols. [138] evaluaron la diversidad del microbioma oral en diferentes grados de inflamación del TPD. A diferencia de

nuestros resultados, ellos observaron que a medida que la inflamación pulpar progresaba, *Actinobacteria* spp. disminuía, mientras que *Firmicutes* spp. aumentaba.

De manera interesante, tanto Belstrøm como cols. [137] y Zheng y cols. [138] reportaron un aumento en la AR de *Lactobacillus* spp. en presencia de caries al igual que este estudio. Particularmente, Zheng y cols. observaron un aumento notable de este género en la MB de PDB supragingival de dientes diagnosticados con pulpitis sintomática irreversible, demostrando una fuerte asociación entre la profundidad de la caries y la presencia de pulpitis reversible o irreversible. Debido a las limitaciones de este estudio, no fue posible valorar los dientes extraídos para conocer el diagnóstico clínico del estado de salud del TPD, sin embargo, nuestros hallazgos podrían respaldar lo reportado por Zheng y cols., ya que, en este estudio, se analizó la MB directamente de las lesiones de caries; en conjunto, ambos hallazgos podrían tener un gran valor clínico para el diagnóstico de las patologías pulpares.

Nuestros hallazgos también concuerdan con Ferraz Caneppele y cols. [139] quienes describieron una mayor AR de *Lactobacillus* spp, *Capnocytophaga sputigena*, y *Leptotrichia buccalis* en dientes con caries profundas y sintomáticas. Adicionalmente, ellos concluyeron que la caries sintomática no parece estar correlacionada con la carga bacteriana, sino la concentración de endotoxinas, y esto es independiente del área muestreada.

Por otra parte, los resultados de Benítez Páez y cols. [14], contrastan con los hallazgos de esta investigación. Ellos identificaron a *Actinomyces* spp. como el género más abundante en condiciones de salud bucal y *Porphyromonas*, *Fusobacterium* spp., *Capnocytophaga* spp., *Tannerella* spp., y *Leptotrichia* spp. como los géneros más abundantes en enfermedad [14]. Sin embargo, Simón-Soro y cols. [140], difieren con los resultados de este estudio, ya que ellos observaron que, en la placa dental de la superficie de dientes sanos, predomina *Fusobacterium* spp., seguido de *Neisseria* spp. y *Streptococcus* spp.

Lo anterior confirma que la diversidad de la MB asociada a caries se modifica de acuerdo con el grado de la enfermedad; lo cual se puede asociar a diferentes factores intrínsecos y extrínsecos modificadores del medio ambiente, por ejemplo, localización de la lesión, los tipos de tejidos dentales comprometidos durante la enfermedad; los cuales difieren en sus características fisicoquímicas, modificando así el microambiente y por tanto los perfiles taxonómicos bacterianos.

Dado que las interacciones intra e intermicrobianas son relevantes en la patogénesis de la caries, éstas han sido investigadas por diferentes autores, al igual que en este estudio. De acuerdo a lo anterior, es relevante señalar que los hallazgos en este estudio muestran patrones de correlación interbacterianas, semejantes a lo previamente descrito por Belstrøm y cols. [141] en MB salival de población danesa. Ellos reportaron una mayor diversidad de *Neisseria*, *Haemophilus* y *Fusobacterium* en la MB salival de sujetos sanos en comparación con individuos con alta prevalencia de caries. Así mismo, estos géneros asociados a salud mostraron una evidente agrupación. Estos resultados son interesantes, ya que ambos concordamos, aun considerando las diferencias entre las poblaciones estudiadas, así como el tipo de muestra y modelo usados para el análisis de la MB oral. Las similitudes entre estos dos estudios, a pesar de los distintos sitios muestreados (placa dental supragingival versus saliva) posiblemente refleja la existencia de factores determinantes independientemente del nicho oral muestreado. Sin embargo, también concordamos con algunos investigadores que han argumentado que el comparar datos sitio específicos es imperativo [142] para obtener una mejor comprensión de una enfermedad crónica irreversible local de la cavidad oral, como la caries [143].

Por otra parte, Gómez y cols. [114] reportaron una estrecha relación de *Streptococcus* con *Rothia*, *Actinomyces*, y *Selenomonas* en caries. Estas bacterias se han descrito como marcadores predictivos de lesiones cariosas. Adicionalmente, *Tannerella* y *P. olorum* también

*se han asociado* con caries. Así mismo, Simón-Soro y cols. [112] reportaron una relación antagónica entre *Streptococcus*, *Fusobacterium* y *Aggregatibacter* en individuos con caries. Nuestros hallazgos contrastan parcialmente con ambos autores, ya que, de acuerdo con este estudio, podríamos proponer a *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas* y *Haemophilus* como marcadores predictivos de enfermedad o salud dental, respectivamente en mexicanos. Lo discutido anteriormente, es relevante ya que se proponen diferentes indicadores de acuerdo con la estabilidad de la MB oral entre poblaciones, lo cual es relevante para establecer blancos terapéuticos para caries dental.

Se ha observado que, la expresión diferencial de algunos TLR y citocinas en el TPD podría estar relacionada con el grado de caries, así como parece estar correlacionada con la concentración de endotoxinas y no a la carga bacteriana, independientemente del área muestreada [139]. Por lo anterior diferentes autores han correlacionado la MB salival y PDB en caries [115], [116], [137], [140], [141], [144], mientras que, de manera independiente otros estudios *in vitro* han evaluado la expresión de TLR y citocinas proinflamatorias en el TPD [41], [145]–[149]; así como en diferentes líneas de células pulpares dentales retadas, de manera *in vitro*, con diferentes MAMPs de bacterias grampositivas y gramnegativas. Estos hallazgos *in vitro* permitieron asociar los perfiles de expresión diferencial de los marcadores inflamatorios con las bacterias asociadas a caries [145], [150]. Sin embargo, actualmente es importante llevar a cabo estudios a nivel de caries que integren la microbioma oral y respuesta inmune. Hasta donde sabemos, este estudio es el primer informe que analiza de manera pareada, ambos ejes (MB y respuesta inmune) en dos modelos (órgano dental y tejido pulpar) expuestos de manera *in vivo* a la historia natural de la enfermedad.

Nuestros resultados concuerdan con Colombini-Ishikiriama y cols. [151] y Keller y cols. [152] observaron una expresión diferencial de IL1 $\beta$ , IL6, CXCL8, TNF $\alpha$  e IL10 en cultivos de Fbs pulpares de dientes deciduos estimulados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* 1 (EcLPS) o

ácido lipoteicoico de *Enterococcus faecalis* (E<sub>f</sub>LTA). Así mismo, concordamos con Farges y cols., quienes estimularon células odontoblásticas con ácido lipoteicoico (LTA) y Pam2CSK4 y observaron un fuerte incremento de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6 y CXCL8 [40]. Adicionalmente, observaron una expresión constitutiva de IL10 en TPD sano. Este hallazgo respalda lo reportado en este estudio donde IL10 se expresó de manera semejante tanto en el tejido pulpar sano y expuesto a caries moderada.

Reconocemos que este estudio tiene varias limitaciones. Primero, esta es una muestra pequeña, el tamaño de la muestra del grupo libre de caries es menor que el del grupo de caries. Además, se compararon dos tipos de muestra diferentes, la PDB supragingival y la dentina. Sin embargo, el concepto de estudio fue transversal de dos estados diferentes (salud oral vs. caries moderada de dentina) para encontrar los principales patrones discriminadores. El diseño del estudio es transversal. Además, aunque se observaron diferencias entre el grupo sin caris y con caries, nuestros resultados deben interpretarse con precaución debido a las limitaciones en el poder estadístico inherentes a los tamaños de muestra pequeños. También reconocemos que no ajustamos las variables de confusión; Al comparar las variables clínicas y demográficas entre estos dos grupos, no encontramos diferencias en edad o sexo. Este estudio es, hasta donde sabemos, el primero en describir la MB oral en sujetos mexicanos con y sin caries.

La fuerza de este estudio es que el microbioma oral asociado con la caries se evaluó concomitantemente con la respuesta inmune innata (la expresión de TLR y marcadores inflamatorios) del TPD expuesto *in vivo* a caries moderada de dentina. La caries moderada de los dientes analizados tuvo una evolución natural de la enfermedad en condiciones de vida libre.

Finalmente, desde una perspectiva más amplia, la relevancia clínica de este estudio puede discutirse desde diferentes perspectivas: I) a nivel local; la MB de caries moderada de dentina

participa diferencialmente en diferentes vías como la disminución del pH, el metabolismo de carbohidratos, la producción de MAMPs (ALT y LPS), así como en el quorum sensing y químiotaxis [153]. Lo anterior, establece un microambiente e interacciones estrechas intermicrobianas que favorecen condiciones cariogénicas. El microbioma oral no sólo desempeña un papel importante en el desarrollo de diferentes grados de caries y enfermedad periodontal; sino que también los cambios en la MB salival y la PDB pueden estar asociados con enfermedades orales de mucosas, que son de interés público, como leucoplasia oral (LO) [154], liquen plano oral (LPO) [155], lupus eritematoso sistémico (LES) [156], [157], cáncer oral (COCE) [158]–[160] y complicaciones durante ciertos tratamientos como peri-implantis. [4], [13], [161].

II) a nivel sistémico; la presencia de la MB oral implicadas en el desarrollo de la caries y la enfermedad periodontal se ha asociado con enfermedades sistémicas. Dado que los géneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Tannerella* y *Leptotrichia* han estado estrechamente relacionados con la patogénesis de trastornos sistémicos como la artritis reumatoide, infecciones recurrentes en las vías respiratorias, enfermedades pulmonares y cardiovasculares, alteraciones hepáticas y metabólicas como resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y obesidad [4], enfermedades inflamatorias intestinales [162], [163], embarazo prematuro [164], diferentes tipos de cáncer [165]–[168], así como alteraciones nerviosas y cognitivas [169]–[171], entre otros. Éstos, han llegado a ser contemplados como posibles blancos terapéuticos [172], así como indicadores de riesgo para la detección temprana de enfermedades orales o sistémicas. Por el contrario, los géneros y especies de *Neisseria* y *Streptococcus* [18], [173]–[175] que están asociados con la salud pueden servir como marcadores pronósticos de protección de enfermedad e incluso como parte de terapias alternativas para revertir la disbiosis y restaurar la salud.

## Conclusiones

Se encontró una estructura de comunidad bacteriana distinta y una expresión diferencial de marcadores de RII en caries de individuos mexicanos, con dos géneros, *Olsenella* y *Parascardovia*, encontrados exclusivamente en caries moderada de dentina, e IL1 $\beta$ , IL6 y CXCL8 sobreexpresados en caries. Los hallazgos reportados sugieren que diferentes poblaciones de células pulpares, muy probablemente Obs y Fbs, pueden desempeñar un papel relevante en la modulación de la respuesta inmune del TPD crónicamente expuesto a los géneros *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Porphyromonas*; promoviendo la estimulación de las células del TPD por distintos MAMP, incluyendo LTA y lipopolisacárido (LPS). Esta modulación puede ocurrir a través de TLRs, activando cascadas de señalización intracelular para las citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$  e IL6 y la quimiocina CXCL8. Es imperativo obtener información no solo sobre los perfiles microbianos asociados con la caries con un grado de progresión moderado, sino también dilucidar cómo responde la inmunidad innata del TPD afectada. Esto podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias dirigidas para el tratamiento de la caries, teniendo en cuenta los perfiles bacterianos de microbioma oral.

## Referencias

- [1] S. L. James *et al.*, “Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017,” *The Lancet*, vol. 392, no. 10159, pp. 1789–1858, Nov. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.
- [2] G. Lomelí-Buyoli, A. M. Mejía-González, and K. Rodríguez-González, “Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales SIVEPAB 2020,” Ciudad de México, 2020.
- [3] G. Liu, C. Wu, W. R. Abrams, and Y. Li, “Structural and Functional Characteristics of the Microbiome in Deep-Dentin Caries,” *J Dent Res*, vol. 99, no. 6, pp. 713–720, Jun. 2020, doi: 10.1177/0022034520913248.
- [4] L. Gao, T. Xu, G. Huang, S. Jiang, Y. Gu, and F. Chen, “Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body,” *Protein Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 488–500, May 2018, doi: 10.1007/S13238-018-0548-1.
- [5] M. Levy, A. A. Kolodziejczyk, C. A. Thaiss, and E. Elinav, “Dysbiosis and the immune system,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 17, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 219–232, Apr. 01, 2017. doi: 10.1038/nri.2017.7.
- [6] V. Iebba *et al.*, “Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota SuMMARy,” *New Microbiologica*, vol. 39, pp. 1–12, 2016.
- [7] K. Hou *et al.*, “Microbiota in health and diseases”, doi: 10.1038/s41392-022-00974-4.
- [8] C. Petersen and J. L. Round, “Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease,” *Cellular Microbiology*, vol. 16, no. 7. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1024–1033, 2014. doi: 10.1111/cmi.12308.
- [9] C. R. Tiffany and A. J. Bäumlér, “Dysbiosis: From fiction to function,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 317, no. 5, pp. G602–G608, Nov. 2019, doi: 10.1152/AJPGI.00230.2019.
- [10] A. C. R. Tanner, C. A. Kressirer, S. Rothmiller, I. Johansson, and N. I. Chalmers, “The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis,” *Adv Dent Res*, vol. 29, no. 1, pp. 78–85, 2018, doi: 10.1177/0022034517736496.
- [11] A. S. S. Giriya and P. S. Ganesh, “Functional biomes beyond the bacteriome in the oral ecosystem,” *Japanese Dental Science Review*, vol. 58. Elsevier Ltd, pp. 217–226, Nov. 01, 2022. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.05.002.
- [12] T. Chen, W.-H. Yu, J. Izard, O. V. Baranova, A. Lakshmanan, and F. E. Dewhirst, “The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information,” *Database*, vol. 2010, no. 0, pp. baq013–baq013, 2010, doi: 10.1093/database/baq013.
- [13] A. P. Gómez García, Y. López Vidal, and M. M. Aguirre García, “Microbioma oral: variabilidad entre regiones y poblaciones,” *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 65, no. 5, pp. 8–19, Sep. 2022, doi: 10.22201/fm.24484865e.2022.65.5.02.
- [14] A. Benítez-Páez, P. Belda-Ferre, A. Simón-Soro, and A. Mira, “Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms,” *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-311.
- [15] J. L. Baker, B. Bor, M. Agnello, W. Shi, and X. He, “Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria,” *Trends Microbiol*, vol. 25, no. 5, pp. 362–374, 2017, doi: 10.1016/j.tim.2016.12.012.
- [16] X. Peng *et al.*, “Oral microbiota in human systematic diseases,” *Int J Oral Sci*, vol. 14, no. 1, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1038/s41368-022-00163-7.

- [17] I. F. Escapa, T. Chen, Y. Huang, P. Gajare, F. E. Dewhirst, and K. P. Lemon, “New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract,” *mSystems*, vol. 3, no. 6, pp. 1–20, 2018, doi: 10.1128/msystems.00187-18.
- [18] A. Zbinden, N. Bostanci, and G. N. Belibasakis, “The novel species *Streptococcus tigurinus* and its association with oral infection,” *Virulence*, vol. 6, no. 3. Landes Bioscience, pp. 177–182, Nov. 17, 2015. doi: 10.4161/21505594.2014.970472.
- [19] D. Belstrøm *et al.*, “Altered bacterial profiles in saliva from adults with caries lesions: A case-cohort study,” *Caries Res*, vol. 48, no. 5, pp. 368–375, Apr. 2014, doi: 10.1159/000357502.
- [20] N. Takahashi and B. Nyvad, “The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives,” *J Dent Res*, vol. 90, no. 3, pp. 294–303, 2011, doi: 10.1177/0022034510379602.
- [21] K. S. Fakhruddin, H. C. Ngo, and L. P. Samaranayake, “Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview,” *Oral Dis*, vol. 25, no. 4, pp. 982–995, 2019, doi: 10.1111/odi.12932.
- [22] D. S. Bezerra, R. N. Stipp, B. G. Neves, S. F. F. Guedes, M. M. Nascimento, and L. K. A. Rodrigues, “Insights into the Virulence Traits of *Streptococcus mutans* in Dentine Carious Lesions of Children with Early Childhood Caries,” *Caries Res*, vol. 50, no. 3, pp. 279–287, 2016, doi: 10.1159/000445256.
- [23] J. A. Aas *et al.*, “Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults,” *J Clin Microbiol*, vol. 46, no. 4, pp. 1407–1417, Apr. 2008, doi: 10.1128/JCM.01410-07.
- [24] D. Wolff, C. Frese, K. Schoilew, A. Dalpke, B. Wolff, and S. Boutin, “Amplicon-based microbiome study highlights the loss of diversity and the establishment of a set of species in patients with dentin caries,” *PLoS One*, vol. 14, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0219714.
- [25] D. Wolff, C. Frese, T. Maier-Kraus, T. Krueger, and B. Wolff, “Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects,” *Caries Res*, vol. 47, no. 1, pp. 69–77, Jan. 2013, doi: 10.1159/000344022.
- [26] M. A. Munson, A. Banerjee, T. F. Watson, and W. G. Wade, “Molecular analysis of the microflora associated with dental caries,” *J Clin Microbiol*, vol. 42, no. 7, pp. 3023–3029, Jul. 2004, doi: 10.1128/JCM.42.7.3023-3029.2004.
- [27] K. L. Chhour, M. A. Nadkarni, R. Byun, F. E. Martin, N. A. Jacques, and N. Hunter, “Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries,” *J Clin Microbiol*, vol. 43, no. 2, pp. 843–849, Feb. 2005, doi: 10.1128/JCM.43.2.843-849.2005.
- [28] “beighton2005”.
- [29] J. A. Aas *et al.*, “Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults,” *J Clin Microbiol*, vol. 46, no. 4, pp. 1407–1417, Apr. 2008, doi: 10.1128/JCM.01410-07.
- [30] A. Mazzoni *et al.*, “Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability,” *Journal of Dental Research*, vol. 94, no. 2. SAGE Publications Inc., pp. 241–251, Feb. 22, 2015. doi: 10.1177/0022034514562833.
- [31] N. Takahashi and B. Nyvad, “Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries,” *Caries Res*, vol. 50, no. 4, pp. 422–431, 2016, doi: 10.1159/000447309.
- [32] R. H. Selwitz, A. Ismail, and N. Pitts, “Dental caries,” *Lancet*, vol. 369, no. 9555, pp. 51–59, Jan. 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2.
- [33] K. H. Kwack and H. W. Lee, “Clinical Potential of Dental Pulp Stem Cells in Pulp Regeneration: Current Endodontic Progress and Future Perspectives,” *Frontiers in Cell*

- and Developmental Biology*, vol. 10. Frontiers Media S.A., Apr. 11, 2022. doi: 10.3389/fcell.2022.857066.
- [34] J. J. Lin *et al.*, “Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats,” *Sci Rep*, vol. 5, Jul. 2015, doi: 10.1038/srep12549.
- [35] H. Mojtahedi *et al.*, “Effects of Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* on Gene Expression Levels of Toll-like Receptors and Inflammatory Cytokines in Human Dental Pulp Stem Cells,” *Iranian Journal of Immunology*, vol. 19, no. 3, pp. 299–310, Sep. 2022, doi: 10.22034/iji.2022.92223.2136.
- [36] H. W. Jiang, W. Zhang, B. P. Ren, J. F. Zeng, and J. Q. Ling, “Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue,” *J Endod*, vol. 32, no. 8, pp. 747–751, Aug. 2006, doi: 10.1016/J.JOEN.2006.01.010.
- [37] N. Mutoh, N. Tani-Ishii, K. Tsukinoki, K. Chieda, and K. Watanabe, “Expression of Toll-like Receptor 2 and 4 in Dental Pulp,” *J Endod*, vol. 33, no. 10, pp. 1183–1186, 2007, doi: 10.1016/j.joen.2007.05.018.
- [38] L. G. Levin, A. Rudd, A. Bletsa, and H. Reisner, “Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro,” *Eur J Oral Sci*, vol. 107, no. 2, pp. 131–137, 1999, doi: 10.1046/j.0909-8836.1999.eos107209.x.
- [39] W. He *et al.*, “LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells,” *Int Endod J*, vol. 46, no. 2, pp. 128–136, 2013, doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02096.x.
- [40] J. C. Farges *et al.*, “Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement,” *Immunobiology*, vol. 216, no. 4, pp. 513–517, 2011, doi: 10.1016/j.imbio.2010.08.006.
- [41] J. Farges and D. Lyon, “Expression of NOD2 is increased in inflamed human dental pulps and lipoteichoic,” vol. 17, no. 1, pp. 29–34, 2015.
- [42] C. Lo Hahn and F. R. Liewehr, “Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries,” *J Endod*, vol. 33, no. 6, pp. 643–651, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.joen.2007.01.001.
- [43] C. C. R. Ferraz, M. A. Henry, K. M. Hargreaves, and A. Diogenes, “Lipopolysaccharide from *porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors,” *J Endod*, vol. 37, no. 1, pp. 45–48, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.joen.2007.07.001.
- [44] R. Wadachi and K. M. Hargreaves, “Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: A mechanism for pain due to infection,” *J Dent Res*, vol. 85, no. 1, pp. 49–53, Jan. 2006, doi: 10.1177/154405910608500108.
- [45] A. Hasan *et al.*, “Gene expression analysis of toll like receptor 2 and 4, Dectin-1, Osteopontin and inflammatory cytokines in human dental pulp ex-vivo,” *BMC Oral Health*, vol. 22, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12903-022-02621-4.
- [46] C. lo Hahn and F. R. Liewehr, “Innate Immune Responses of the Dental Pulp to Caries,” *J Endod*, vol. 33, no. 6, pp. 643–651, 2007, doi: 10.1016/j.joen.2007.01.001.
- [47] C. Lo Hahn and F. R. Liewehr, “Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp,” *J Endod*, vol. 33, no. 7, pp. 773–781, 2007, doi: 10.1016/j.joen.2007.01.002.
- [48] M. Pourhajibagher *et al.*, “Quorum quenching of *Streptococcus mutans* via the nano-quercetin-based antimicrobial photodynamic therapy as a potential target for cariogenic biofilm,” *BMC Microbiol*, vol. 22, no. 1, pp. 1–18, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12866-022-02544-8.
- [49] “Sci-Hub | Pathophysiology of Dental Caries. Monographs in Oral Science, 1–10 | 10.1159/000487826.” <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1159/000487826> (accessed Sep. 24, 2022).

- [50] Y. Yamashita and T. Takeshita, "The oral microbiome and human health," *J Oral Sci*, vol. 59, no. 2, pp. 201–206, 2017, doi: 10.2334/josnusd.16-0856.
- [51] A. J. Camelo-Castillo *et al.*, "Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking," *Front Microbiol*, vol. 6, no. FEB, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00119.
- [52] M. F. Zarco, T. J. Vess, and G. S. Ginsburg, "The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine," *Oral Dis*, vol. 18, no. 2, pp. 109–120, 2012, doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x.
- [53] N. Nørskov-Lauritsen, R. Claesson, A. B. Jensen, C. H. Åberg, and D. Haubek, "Aggregatibacter Actinomycetemcomitans: Clinical significance of a pathobiont subjected to ample changes in classification and nomenclature," *Pathogens*, vol. 8, no. 4, pp. 1–18, 2019, doi: 10.3390/pathogens8040243.
- [54] L. Gao, T. Xu, G. Huang, S. Jiang, Y. Gu, and F. Chen, "Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body," *Protein Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 488–500, 2018, doi: 10.1007/s13238-018-0548-1.
- [55] A. Simón-Soro, P. Belda-Ferre, R. Cabrera-Rubio, L. D. Alcaraz, and A. Mira, "A tissue-dependent hypothesis of dental caries," *Caries Res*, vol. 47, no. 6, pp. 591–600, Nov. 2013, doi: 10.1159/000351663.
- [56] "Ten Cate Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função - Google Libros." <https://books.google.com.pe/books?id=qWnVzJ9462kC&printsec=copyright#v=onepage&q&f=false> (accessed Oct. 16, 2022).
- [57] "Seltzer and Bender's Dental Pulp." [http://www.quintpub.com/display\\_detail.php3?psku=b4152#.Y03yTS9t8go](http://www.quintpub.com/display_detail.php3?psku=b4152#.Y03yTS9t8go) (accessed Oct. 16, 2022).
- [58] "ENDODONTICS6", Accessed: Oct. 16, 2022. [Online]. Available: [www.konkur.in](http://www.konkur.in)
- [59] C. lo Hahn and F. R. Liewehr, "Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis," *J Endod*, vol. 33, no. 3, pp. 213–219, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.joen.2006.11.008.
- [60] H. Trowbridge and T. Daniels, "Abnormal immune response to infection of the dental pulp. Report of a case," *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, vol. 43, no. 6, pp. 902–909, 1977, doi: 10.1016/0030-4220(77)90084-6.
- [61] G. Bergenholtz, "Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation," *J Endod*, vol. 7, no. 3, pp. 100–104, 1981, doi: 10.1016/S0099-2399(81)80122-7.
- [62] C. lo Hahn and F. R. Liewehr, "Update on the Adaptive Immune Responses of the Dental Pulp," *J Endod*, vol. 33, no. 7, pp. 773–781, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.joen.2007.01.002.
- [63] "Clasificación de caries dental." <https://www.slideshare.net/Kaki2501p/clasificacin-de-caries-dental-17378643> (accessed Oct. 16, 2022).
- [64] "ODONTOBLASTO Origen, Morfología, Función y Destino. - PDF Free Download." <https://docplayer.es/15134758-Odontoblasto-origen-morfologia-funcion-y-destino.html> (accessed Oct. 16, 2022).
- [65] T. Sasaki and P. R. Garant, "Structure and Organization of Odontoblasts," *Anat Rec*, vol. 245, no. 235, p. 249, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2.
- [66] K. Sakurai, T. Okiji, and H. Suda, "Co-increase of Nerve Fibers and HLA-DR-and/or Factor-XIIIa-expressing Dendritic Cells in Dentinal Caries-affected Regions of the Human Dental Pulp: An Immunohistochemical Study," *J Dent Res*, vol. 78, no. 10, pp. 1596–1608, 1999, doi: 10.1177/00220345990780100401.
- [67] H. Ohshima, K. Nakakura-Ohshima, K. Takeuchi, M. Hoshino, Y. Takano, and T. Maeda, "Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells," *Microsc Res Tech*, vol. 60, no. 5, pp. 483–490, Apr. 2003, doi: 10.1002/JEMT.10289.

- [68] M. Jontell, M. N. Gunraj, and G. Bergenholtz, "Immunocompetent Cells in the Normal Dental Pulp," *J Dent Res*, vol. 66, no. 6, pp. 1149–1153, 1987, doi: 10.1177/00220345870660061101.
- [69] M. Torabinejad and J. D. Kettering, "Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions," *J Endod*, vol. 11, no. 3, pp. 122–125, 1985, doi: 10.1016/S0099-2399(85)80230-2.
- [70] H. O. Trowbridge, "Immunological aspects of chronic inflammation and repair," *J Endod*, vol. 16, no. 2, pp. 54–61, 1990, doi: 10.1016/S0099-2399(06)81564-5.
- [71] W. H. Pulver, M. A. Taubman, and D. J. Smith, "Immune components in normal and inflamed human dental pulp," *Arch Oral Biol*, vol. 22, no. 2, pp. 103–111, 1977, doi: 10.1016/0003-9969(77)90086-3.
- [72] O. Veerayutthwilai, M. R. Byers, T. T. T. Pham, R. P. Darveau, and B. A. Dale, "Differential regulation of immune responses by odontoblasts," *Oral Microbiol Immunol*, vol. 22, no. 1, pp. 5–13, Feb. 2007, doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00310.x.
- [73] M. Goldberg *et al.*, "Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair," *Pharmacol Res*, vol. 58, no. 2, pp. 137–147, 2008, doi: 10.1016/J.PHRS.2008.05.013.
- [74] N. Kawashima, T. Okiji, T. Kosaka, and H. Suda, "Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study," *J Endod*, vol. 22, no. 6, pp. 311–316, Jan. 1996, doi: 10.1016/S0099-2399(96)80266-4.
- [75] Mousavi S.B., Talebi A., and Kianoosh S., "Immunohistochemical Assessment of Natural Killer cells in normal and inflamed Dental Pulp," *JRMS*, vol. 11, no. 2, pp. 119–121, Oct. 2006.
- [76] M. Jontell, T. Okiji, U. Dahlgren, and G. Bergenholtz, "Immune defense mechanisms of the dental pulp," *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, vol. 9, no. 2, pp. 179–200, 1998, doi: 10.1177/10454411980090020301.
- [77] T. Nakanishi, K. Takahashi, Y. Hosokawa, T. Adachi, H. Nakae, and T. Matsuo, "Expression of macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  in human inflamed dental pulp tissue," *J Endod*, vol. 31, no. 2, pp. 84–87, 2005, doi: 10.1097/01.DON.0000143414.22112.57.
- [78] H. O. Trowbridge, "Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries," *J Endod*, vol. 7, no. 2, pp. 52–60, 1981, doi: 10.1016/S0099-2399(81)80242-7.
- [79] M. A. Anwar, M. Shah, J. Kim, and S. Choi, "Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics," *Med Res Rev*, vol. 39, no. 3, pp. 1053–1090, May 2019, doi: 10.1002/MED.21553.
- [80] M. Mesa-Villanueva and P. Patiño, "Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro," *Inmunología (1987)*, pp. 115–130, 2006.
- [81] C. T. Hanks *et al.*, "Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae," *Connect Tissue Res*, vol. 37, no. 3–4, pp. 233–249, 1998, doi: 10.3109/03008209809002442.
- [82] J. Aluri, M. A. Cooper, and L. G. Schuettpelez, "Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system," *Cells*, vol. 10, no. 6. MDPI, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/cells10061374.
- [83] J. L. Casanova, L. Abel, and L. Quintana-Murci, "Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 447–491, 2011.
- [84] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, "Inmunología celular y molecular," p. 600.
- [85] G. W. Litman, J. P. Rast, S. D. Fugmann, and H. Lee, "The origins of vertebrate adaptive immunity," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 8, pp. 543–553, 2010, doi: 10.1038/nri2807.

- [86] A. M. Silverstein, “Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute,” 2003, Accessed: Oct. 16, 2022. [Online]. Available: <http://www.nature.com/natureimmunology>
- [87] M. F. Flajnik and L. du Pasquier, “Evolution of innate and adaptive immunity: Can we draw a line?,” *Trends Immunol*, vol. 25, no. 12, pp. 640–644, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.it.2004.10.001.
- [88] A. M. Silverstein, “Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute,” 2003. [Online]. Available: <http://www.nature.com/natureimmunology>
- [89] J. C. Farges *et al.*, “Odontoblasts in the dental pulp immune response,” *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, vol. 312, no. 5, pp. 425–436, 2009, doi: 10.1002/jez.b.21259.
- [90] R. A. Barkhordar, Q. P. Ghani, T. R. Russell, and M. Z. Hussain, “Interleukin-1 $\beta$  activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts,” *J Endod*, vol. 28, no. 3, pp. 157–159, 2002, doi: 10.1097/00004770-200203000-00003.
- [91] S. H. T. S. I.-T. T. and O. H., “Balance of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions,” *J Endod*, vol. 24, no. 2, pp. 116–119, 1998, doi: 10.1016/S0099-2399(98)80089-7.
- [92] L. V. B. R. and M. HH., “Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis,” *J Endod*, vol. 24, no. 6, pp. 409–413, 1998, doi: 10.1016/S0099-2399(98)80022-8.
- [93] M. Zehnder, N. Delaleu, Y. Du, and M. Bickel, “Cytokine gene expression - Part of host defence in pulpitis,” *Cytokine*, vol. 22, no. 3–4, pp. 84–88, 2003, doi: 10.1016/S1043-4666(03)00116-9.
- [94] S. K. Bromley, T. R. Mempel, and A. D. Luster, “Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic,” *Nat Immunol*, vol. 9, no. 9, pp. 970–980, 2008, doi: 10.1038/ni.f.213.
- [95] F. Sallusto and M. Baggiolini, “Chemokines and leukocyte traffic,” *Nat Immunol*, vol. 9, no. 9, pp. 949–952, 2008, doi: 10.1038/ni.f.214.
- [96] A. Rot and U. H. von Andrian, “Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells,” *Annu Rev Immunol*, vol. 22, pp. 891–928, 2004, doi: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.22.012703.104543.
- [97] S. Nagaoka *et al.*, “Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide,” *J Endod*, vol. 22, no. 1, pp. 9–12, 1996, doi: 10.1016/S0099-2399(96)80228-7.
- [98] G. T. J. Huang, A. P. Potente, J. W. Kim, N. Chugal, and X. Zhang, “Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps,” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 88, no. 2, pp. 214–220, 1999, doi: 10.1016/S1079-2104(99)70118-6.
- [99] S. A. Mosaddad *et al.*, “Oral microbial biofilms: an update,” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 38, no. 11, pp. 2005–2019, 2019, doi: 10.1007/s10096-019-03641-9.
- [100] J. Walter and R. Ley, “The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes,” *Annu Rev Microbiol*, vol. 65, no. 1, pp. 411–429, Oct. 2011, doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102830.
- [101] and R. K. Luke K Ursell, Jessica L Metcalf, Laura Wegener Parfrey, “Defining the Human Microbiome,” *NIH Manuscripts*, vol. 70, no. Suppl 1, pp. 1–12, 2013, doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x.Defining.
- [102] M. H. Mohajeri *et al.*, “The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications,” *Eur J Nutr*, vol. 0, no. 0, p. 0, 2018, doi: 10.1007/s00394-018-1703-4.

- [103] D. Verma, P. K. Garg, and A. K. Dubey, “Insights into the human oral microbiome,” *Arch Microbiol*, vol. 200, no. 4, pp. 525–540, 2018, doi: 10.1007/s00203-018-1505-3.
- [104] F. E. Dewhirst *et al.*, “The human oral microbiome,” *J Bacteriol*, vol. 192, no. 19, pp. 5002–5017, Oct. 2010, doi: 10.1128/JB.00542-10.
- [105] N. Topcuoglu and G. Kulekci, “16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis,” *Anaerobe*, vol. 35, no. January, pp. 35–40, 2015, doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.01.011.
- [106] K. L. Hoffman *et al.*, “Oral microbiota reveals signs of acculturation in Mexican American women,” *PLoS One*, vol. 13, no. 4, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0194100.
- [107] Z. Ma and W. Li, “How and Why Men and Women Differ in Their Microbiomes: Medical Ecology and Network Analyses of the Microgenderome,” *Advanced Science*, vol. 6, no. 23, 2019, doi: 10.1002/advs.201902054.
- [108] K. C. Anukam, N. Regina Agbakoba, I. N. Onwuzor, N. A. Olise, M. Duru, and N. R. Agbakoba, “Oral Bacteriome Compositions Identified by 16S rRNA Metagenomics in a Randomly Selected ‘Healthy’ Nigerian Male and Female Subjects Relative abundance of the micro biome and functional prediction from different body sites of an individual View project Do ,” *International Journal of Research and Reports in Dentistry*, vol. 1, no. 1, p. 44125, 2018, doi: 10.9734/IJRRD/2018/44125.
- [109] A. Mulak, M. Larauche, and Y. Taché, “Sexual Dimorphism in the Gut Microbiome: Microgenderome or Microsexome?,” *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, vol. 28, no. 2. Korean Society of Neurogastroenterology and Motility, pp. 332–333, Apr. 01, 2022. doi: 10.5056/jnm21242.
- [110] M. B. Flak, J. F. Neves, and R. S. Blumberg, “Welcome to the microgenderome,” *Science*, vol. 339, no. 6123. American Association for the Advancement of Science, pp. 1044–1045, Mar. 01, 2013. doi: 10.1126/science.1236226.
- [111] A. Wallis, H. Butt, M. Ball, D. P. Lewis, and D. Bruck, “Support for the Microgenderome: Associations in a Human Clinical Population,” *Sci Rep*, vol. 6, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19171.
- [112] Á. Simón-Soro, I. Tomás, R. Cabrera-Rubio, M. D. Catalan, B. Nyvad, and A. Mira, “Microbial geography of the oral cavity,” *J Dent Res*, vol. 92, no. 7, pp. 616–621, 2013, doi: 10.1177/0022034513488119.
- [113] E. Ikeda *et al.*, “Deep sequencing reveals specific bacterial signatures in the subgingival microbiota of healthy subjects,” *Clin Oral Investig*, vol. 23, no. 3, pp. 1489–1493, 2019, doi: 10.1007/s00784-019-02805-3.
- [114] A. Gomez, J. L. Espinoza, D. M. Harkins, and P. Leong, “Host Genetic control of the oral microbiome in Health and Disease,” *Cell Host Microbe*, vol. 22, no. 3, pp. 269–278, 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.08.013. Host.
- [115] A. Simón-Soro, P. Belda-Ferre, R. Cabrera-Rubio, L. D. Alcaraz, and A. Mira, “A tissue-dependent hypothesis of dental caries,” *Caries Res*, vol. 47, no. 6, pp. 591–600, 2013, doi: 10.1159/000351663.
- [116] D. Belstrøm *et al.*, “Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort,” *J Clin Periodontol*, vol. 41, no. 2, pp. 104–112, Feb. 2014, doi: 10.1111/jcpe.12190.
- [117] E. Read, M. A. Curtis, and J. F. Neves, “The role of oral bacteria in inflammatory bowel disease,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 18, no. 10. Nature Research, pp. 731–742, Oct. 01, 2021. doi: 10.1038/s41575-021-00488-4.
- [118] S. M. Vieira *et al.*, “Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans”, doi: 10.1126/science.aar7201.

- [119] A. S. Zevin, L. Mckinnon, A. Burgener, and N. R. Klatt, “Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation HHS Public Access,” *Curr Opin HIV AIDS*, vol. 11, no. 2, pp. 182–190, 2016, doi: 10.1097/COH.0000000000000234.
- [120] L. Bernard-Raichon *et al.*, “Gut microbiome dysbiosis in antibiotic-treated COVID-19 patients is associated with microbial translocation and bacteremia”, doi: 10.1038/s41467-022-33395-6.
- [121] 64th WMA General Assembly, “World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects,” *JAMA*, vol. 310, no. 20, pp. 2191–2194, Nov. 2013, doi: 10.1001/JAMA.2013.281053.
- [122] E. Couve, R. Osorio, and O. Schmachtenberg, “Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries,” *J Dent Res*, vol. 93, no. 8, pp. 788–793, 2014, doi: 10.1177/0022034514539507.
- [123] D. Wolff, C. Frese, K. Schoilew, A. Dalpke, B. Wolff, and S. Boutin, “Amplicon-based microbiome study highlights the loss of diversity and the establishment of a set of species in patients with dentin caries,” *PLoS One*, vol. 14, no. 7, pp. 1–16, Jul. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0219714.
- [124] D. P. R. Herlemann, M. Labrenz, K. Jürgens, S. Bertilsson, J. J. Waniek, and A. F. Andersson, “Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea,” *ISME Journal*, vol. 5, no. 10, pp. 1571–1579, 2011, doi: 10.1038/ismej.2011.41.
- [125] E. Bolyen *et al.*, “Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2,” *Nature Biotechnology*, vol. 37, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 852–857, Aug. 01, 2019. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
- [126] “Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads | Martin | EMBnet.journal.” <https://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200/458> (accessed May 22, 2022).
- [127] D. Kawamoto *et al.*, “Oral Dysbiosis in Severe Forms of Periodontitis Is Associated With Gut Dysbiosis and Correlated With Salivary Inflammatory Mediators: A Preliminary Study,” *Frontiers in oral health*, vol. 2, Oct. 2021, doi: 10.3389/FROH.2021.722495.
- [128] A. M. Garcia-Lemos *et al.*, “Root-Associated Microbial Communities of *Abies nordmanniana*: Insights Into Interactions of Microbial Communities With Antioxidative Enzymes and Plant Growth,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, pp. 1–16, Aug. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01937.
- [129] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes, “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data,” *Nat Methods*, vol. 13, no. 7, pp. 581–583, 2016, doi: 10.1038/nmeth.3869.
- [130] N. A. Bokulich *et al.*, “Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2’s q2-feature-classifier plugin,” *Microbiome*, vol. 6, no. 1, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1186/s40168-018-0470-z.
- [131] I. F Escapa *et al.*, “Construction of habitat-specific training sets to achieve species-level assignment in 16S rRNA gene datasets,” *Microbiome*, vol. 8, no. 1, p. 65, 2020, doi: 10.1186/s40168-020-00841-w.
- [132] S. Weiss *et al.*, “Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics,” pp. 1–18, 2017, doi: 10.1186/s40168-017-0237-y.
- [133] N. Segata *et al.*, “Metagenomic biomarker discovery and explanation,” *Genome Biol*, vol. 12, no. 6, p. R60, 2011, doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.

- [134] A. P. Gómez-García, Y. López-Vidal, S. Pinto-Cardoso, and M. M. Aguirre-García, “Overexpression of proinflammatory cytokines in dental pulp tissue and distinct bacterial microbiota in carious teeth of Mexican Individuals,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, Dec. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.958722.
- [135] M. Haapasalo, H. Ranta, and H. Shah, “*Mitsuokella dentalis* sp. nov. from dental root canals,” *Int J Syst Bacteriol*, vol. 36, no. 4, pp. 566–568, 1986, doi: 10.1099/00207713-36-4-566.
- [136] J. Obata, T. Takeshita, Y. Shibata, W. Yamanaka, and M. Unemori, “Identification of the Microbiota in Carious Dentin Lesions Using 16S rRNA Gene Sequencing,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. 103712, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0103712.
- [137] D. Belstrøm *et al.*, “Differentiation of salivary bacterial profiles of subjects with periodontitis and dental caries,” *J Oral Microbiol*, vol. 7, no. 1, pp. 1–5, 2015, doi: 10.3402/jom.v7.27429.
- [138] J. Zheng *et al.*, “Microbiome of Deep Dentinal Caries from Reversible Pulpitis to Irreversible Pulpitis,” *J Endod*, vol. 45, no. 3, pp. 302-309.e1, 2019, doi: 10.1016/j.joen.2018.11.017.
- [139] T. M. F. Caneppele *et al.*, “Bacterial levels and amount of endotoxins in carious dentin within reversible pulpitis scenarios,” *Clin Oral Investig*, vol. 25, no. 5, pp. 3033–3042, 2021, doi: 10.1007/s00784-020-03624-7.
- [140] A. Simón-Soro and A. Mira, “Solving the etiology of dental caries,” *Trends Microbiol*, vol. 23, no. 2, pp. 76–82, 2015, doi: 10.1016/j.tim.2014.10.010.
- [141] D. Belstrøm *et al.*, “Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience,” *J Oral Microbiol*, vol. 9, no. 1, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1080/20002297.2016.1270614.
- [142] V. P. Richards *et al.*, “Microbiomes of sitespecific dental plaques from children with different caries status,” *Infect Immun*, vol. 85, no. 8, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1128/IAI.00106-17.
- [143] R. A. Giacaman *et al.*, “Understanding dental caries as a non-communicable and behavioral disease: Management implications,” *Front. Oral Health*, pp. 01–10, Aug. 2022.
- [144] P. Belda-Ferre *et al.*, “The oral metagenome in health and disease,” *ISME Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 46–56, 2012, doi: 10.1038/ismej.2011.85.
- [145] M. J. Staquet *et al.*, “Pattern-recognition receptors in pulp defense,” *Adv Dent Res*, vol. 23, no. 3, pp. 296–301, 2011, doi: 10.1177/0022034511405390.
- [146] S. H. Durand *et al.*, “Lipoteichoic Acid Increases TLR and Functional Chemokine Expression while Reducing Dentin Formation in In Vitro Differentiated Human Odontoblasts,” *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 5, pp. 2880–2887, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.5.2880.
- [147] M. L. Couble, J. C. Farges, F. Bleicher, B. Perrat-Mabillon, M. Boudeulle, and H. Magloire, “Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures,” *Calcif Tissue Int*, vol. 66, no. 2, pp. 129–138, 2000, doi: 10.1007/PL00005833.
- [148] E. Renard *et al.*, “Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis,” *J Dent Res*, vol. 95, no. 2, pp. 196–205, 2016, doi: 10.1177/0022034515612086.
- [149] F. Carrouel *et al.*, “Lipopolysaccharide-binding protein inhibits toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid in human odontoblast-like cells,” *J Endod*, vol. 39, no. 8, pp. 1008–1014, 2013, doi: 10.1016/j.joen.2013.04.020.
- [150] J. Farges *et al.*, “Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries,” vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/230251.

- [151] B. L. Colombini-Ishikiriama *et al.*, “What is the response profile of deciduous pulp fibroblasts stimulated with *E. coli* LPS and *E. faecalis* LTA?,” *BMC Immunol*, vol. 21, no. 1, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1186/s12865-020-00367-8.
- [152] J. F. Keller *et al.*, “Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells,” *Immunobiology*, vol. 215, no. 1, pp. 53–59, 2010, doi: 10.1016/j.imbio.2009.01.009.
- [153] M. Kanehisa, “Post-genome Informatics,” *Oxford University Press*, 2000. [https://www.kanehisa.jp/en/about\\_kegg.html](https://www.kanehisa.jp/en/about_kegg.html) (accessed Jan. 29, 2023).
- [154] A. Amer, S. Galvin, C. M. Healy, and G. P. Moran, “The microbiome of potentially malignant oral leukoplakia exhibits enrichment for *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Campylobacter*, and *Rothia* species,” *Front Microbiol*, vol. 8, no. DEC, pp. 1–9, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02391.
- [155] K. Wang *et al.*, “Preliminary analysis of salivary microbiome and their potential roles in oral lichen planus,” *Sci Rep*, vol. 6, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/srep22943.
- [156] J. D. Corrêa *et al.*, “Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: Association with periodontal status,” *Microbiome*, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1186/s40168-017-0252-z.
- [157] C. P. C. Marques, Y. Maor, M. S. de Andrade, V. P. Rodrigues, and B. B. Benatti, “Possible evidence of systemic lupus erythematosus and periodontal disease association mediated by Toll-like receptors 2 and 4,” *Clin Exp Immunol*, vol. 183, no. 2, pp. 187–192, Feb. 2016, doi: 10.1111/cei.12708.
- [158] C. M. Healy and G. P. Moran, “The microbiome and oral cancer: More questions than answers,” *Oral Oncol*, vol. 89, no. December 2018, pp. 30–33, 2019, doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.12.003.
- [159] P. Gholizadeh, H. Eslami, M. Yousefi, M. Asgharzadeh, M. Aghazadeh, and H. S. Kafil, “Role of oral microbiome on oral cancers, a review,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 84, pp. 552–558, 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.082.
- [160] L. Wang and I. Ganly, “The oral microbiome and oral cancer,” *Clin Lab Med*, vol. 34, no. 4, pp. 711–719, 2014, doi: 10.1016/j.cll.2014.08.004.
- [161] G. I. Lafaurie *et al.*, “Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review,” *J Periodontol*, vol. 88, no. 10, pp. 1066–1089, 2017, doi: 10.1902/jop.2017.170123.
- [162] H. S. Said *et al.*, “Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers,” *DNA Research*, vol. 21, no. 1, pp. 15–25, 2014, doi: 10.1093/dnares/dst037.
- [163] R. Lucas López, M. J. Grande Burgos, A. Gálvez, and R. Pérez Pulido, “The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review,” *Apmis*, vol. 125, no. 1, pp. 3–10, 2017, doi: 10.1111/apm.12609.
- [164] Y. W. Han *et al.*, “Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*,” *Obstetrics and Gynecology*, vol. 115, no. 2 SUPPL. 2 PART. 2, pp. 442–445, 2010, doi: 10.1097/AOG.0b013e3181cb9955.
- [165] I. Kato *et al.*, “Oral microbiome and history of smoking and colorectal cancer,” *J Epidemiol Res*, vol. 2, no. 2, pp. 92–101, 2016, doi: 10.5430/jer.v2n2p92.
- [166] I. Chattopadhyay, M. Verma, and M. Panda, “Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer,” *Technol Cancer Res Treat*, vol. 18, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1177/1533033819867354.
- [167] X. Fan *et al.*, “Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: A population-based nested case-control study,” *Gut*, vol. 67, no. 1, pp. 120–127, Jan. 2018, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312580.

- [168] J. Ahn, C. Y. Chen, and R. B. Hayes, "Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk.," *Cancer Causes Control*, vol. 23, no. 3, pp. 399–404, 2012, doi: 10.1007/s10552-011-9892-7.
- [169] P. Sparks Stein *et al.*, "Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 8, no. 3, pp. 196–203, 2012, doi: 10.1016/j.jalz.2011.04.006.
- [170] S. Poole, S. K. Singhrao, L. Kesavalu, M. A. Curtis, and S. J. Crean, "Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 36, no. 4, pp. 665–677, 2013, doi: 10.3233/JAD-121918.
- [171] Angela R. Kamer, "TNF- $\alpha$  and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects," *J Neuroimmunol*, vol. 30, no. 1–2, pp. 92–97, 2009, doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.08.013. TNF- $\alpha$ .
- [172] S. Yang, J. Zhang, R. Yang, and X. Xu, "Small molecule compounds, a novel strategy against streptococcus mutans," *Pathogens*, vol. 10, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/pathogens10121540.
- [173] P. A. Wescombe, J. D. Hale, N. C. Heng, and J. R. Tagg, "Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*," *Future Microbiol*, vol. 7, no. 12, pp. 1355–1371, 2012, doi: 10.2217/fmb.12.113.
- [174] A. Zbinden, N. Bostanci, and G. N. Belibasakis, "The novel species *Streptococcus tigurinus* and its association with oral infection," *Virulence*, vol. 6, no. 3, pp. 177–182, Nov. 2015, doi: 10.4161/21505594.2014.970472.
- [175] B. Y. Wang and H. K. Kuramitsu, "Interactions between oral bacteria: Inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, no. 1, pp. 354–362, Jan. 2005, doi: 10.1128/AEM.71.1.354-362.2005.

**Anexo: publicaciones científicas generadas a apartir de esta investigación.**

Gómez-García AP, López-Vidal Y, Pinto-Cardoso S, Aguirre-García MM. Overexpression of proinflammatory cytokines in dental pulp tissue and distinct bacterial microbiota in carious teeth of Mexican Individuals. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Dec 8;12:958722. doi: 10.3389/fcimb.2022.958722. PMID: 36569197; PMCID: PMC9772992. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36569197/>

Gómez García Ana Pamela, López Vidal Yolanda, Aguirre García María Magdalena. Microbioma oral: variabilidad entre regiones y poblaciones. Rev. Fac. Med. (Méx.) [revista en la Internet]. 2022 Oct [citado 2023 Mayo 14] ; 65( 5 ): 8-19. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S002617422022000500008&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002617422022000500008&lng=es). Epub 20-Ene-2023. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2022.65.5.02>. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422022000500008&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422022000500008&script=sci_arttext)