

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**Facultat de Medicina i Odontologia**  
**Departament d'Estomatologia**



**ESTUDIO TRANSVERSAL DE LA MICROBIOLOGIA  
SALIVAL MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN EN  
ESCOLARES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA Y SU  
RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Doctoranda: Sonia Gomar Vercher**

**Programa de doctorado: Fisiopatología del Aparato Estomatognático**

**Directores**

**Prof. Dr. José Manuel Almerich Silla**

**Dr. José María Montiel Company**

**València, Septiembre 2012**

## 1. INTRODUCCIÓN

La obtención de muestras de saliva para el presente estudio se llevó a cabo durante el trabajo de campo del estudio epidemiológico de salud oral de los escolares de la Comunidad Valenciana en el año 2010. La realización de este estudio ha sido financiada mediante los proyectos:

- Convocatoria de ayudas para proyectos de investigación en programas de salud, prevención y predicción de la enfermedad, convocadas por la Orden de 21 de diciembre de 2009, de la Conselleria de Sanitat (DOCV núm. 6175, de 30.12.2009) y adjudicadas por la resolución, de este mismo organismo, de 5 de julio de 2010 (DOGV núm. 6319, de 27.07.2010).
- Ayudas de la Universitat de València-Vicerectorado de Investigación: Estudio Epidemiológico de Salud Bucodental en la Población Escolar de la Comunidad Valenciana 2010: (UV-INV-AE11-40221) Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.
- El presente estudio ha sido financiado por la Dirección General de Salud Pública de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana, con la concesión del proyecto de investigación “ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE SALUD BUCODENTAL EN LA POBLACION ESCOLAR DE LA COMUNIDAD VALENCIANA – 2010” (016/2010). Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.



Prof. D. José Manuel Almerich Silla, profesor titular, y  
D. José María Montiel Company, profesor ayudante doctor,  
del Departament d'Estomatologia de la Universitat de València

CERTIFICAN

Que la presente tesis doctoral original de Sonia Gomar Vercher titulada *“ESTUDIO TRANSVERSAL DE LA MICROBIOLOGIA SALIVAL MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN EN ESCOLARES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL”*, ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión y, a nuestro juicio, reúne los requisitos para su lectura y obtención del Grado de Doctor en Odontología.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en València, a veinte de septiembre de dos mil doce.

Prof. Dr. José Manuel Almerich Silla

Dr. José María Montiel Company

## 1. INTRODUCCIÓN

### Agradecimientos

En primer lugar, al Prof. D. José Manuel Almerich Silla, por brindarme su apoyo y confianza, permitiéndome formar parte del Máster de Odontología Clínica Individual y Comunitaria, y posteriormente, del equipo de la Unidad Docente de Odontología Preventiva y Comunitaria. Todas sus enseñanzas me han servido para poder iniciar mi experiencia profesional con una mayor visión clínica de la odontología siendo para mí un gran ejemplo tanto a nivel profesional como personal. Gracias por dirigir este trabajo, por sus consejos, su dedicación y por el apoyo prestado en todo momento. Sin él, esta tesis no hubiera sido posible.

Al Dr. José María Montiel, por su disponibilidad y su gran ayuda en el trabajo estadístico de los datos, por su paciencia, trabajo y tiempo dedicado en ayudarme en la realización de este proyecto. Gracias por su generosidad, por su confianza y por animarme en todo momento.

A los compañeros del Centro Superior de Investigación en Salud Pública, en especial al Dr. Alejandro Mira Obrador, por enseñarme en este campo tan alejado de mi especialidad, por su paciencia y su dedicación. A Raúl, Pedro y Áurea, por vuestro tiempo, generosidad y apoyo.

A todos los compañeros y compañeras de la Unidad Docente de Odontología Preventiva y Comunitaria, por los buenos momentos que hemos compartido en los que he aprendido tanto en lo profesional como en lo personal. Espero seguir disfrutando de todos y cada uno de ellos durante mucho tiempo.

A Teresa y Ana, por ser más que compañeras, amigas. Gracias por cada momento, porque me devolvéis la ilusión y conseguís hacerme sonreír cuando más lo necesito.

A mis amigos y amigas, por el apoyo prestado, por los consejos (odontológicos y no), por saberme escuchar y ayudarme en los momentos difíciles, y sobretodo, por estar a mi lado cuando más lo he necesitado.

## 1. INTRODUCCIÓN

A Juan, porque has estado a mi lado tanto en los buenos momentos como en los no tanto, sufriendo y animándome, apoyándome en este proyecto tan importante para mí. Gracias por sacar lo mejor de mí.

Y por último, y no por ello menos importante, darle las gracias a mi familia, por apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones y por sufrir cada uno de mis proyectos como si fueran propios. Gracias a Rosa, mi madre, y a Paco, mi hermano, por estar siempre a mi lado. Y a Paco, mi padre, porque sé que está orgulloso de mí, esté dónde esté.

A todos, gracias.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	3
1.2. REVISIÓN BIBIOGRÁFICA.....	5
1.2.1. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE SALUD BUCODENTAL EN ESPAÑA.....	5
1.2.2. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE SALUD BUCODENTAL EN LA COMUNIDAD VALENCIANA.....	5
1.2.3. ENFERMEDADES PERIODONTALES Y CARIES.....	6
1.3. CARIES DENTAL.....	7
1.3.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE LA CARIES DENTAL.....	11
1.3.2. CARIES Y PIROSECUENCIACIÓN.....	13
1.3.3. CARIES y MUTANS STREPTOCOCCI.....	16
1.3.4. SALIVA y MUTANS STREPTOCOCCI.....	21
1.3.5. ENFERMEDAD PERIODONTAL y MUTANS STREPTOCOCCI.....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	29
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	31
3.1.1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	32
3.1.2. EXAMINADORES.....	34
3.1.3. AUTORIZACIONES.....	35
3.1.4. MATERIAL UTILIZADO.....	35
3.1.5. FORMULARIO DE EXPLORACIÓN.....	36
3.1.5.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE EXPLORACIÓN.....	36
3.1.5.2.1. CRITERIO DE CARIES: ICDAS II.....	36
3.1.6. PROTOCOLO REALIZADO PARA LA RECOGIDA DE MUESTRA DE SALIVA.....	40
3.1.7. PROTOCOLO SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA NO	

ESTIMULADA PARA ESTUDIO CON PIROSECUENCIACIÓN.....	41
3.1.8. PROTOCOLO SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA ESTIMULADA PARA ESTUDIO CON PIROSECUENCIACIÓN.....	45
3.1.9. EXTRACCIÓN DEL ADN A PARTIR DE LAS MUESTRAS SALIVALES.....	46
3.1.10. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS ORALES MEDIANTE PCR.....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
4.1. ESTUDIO EN MUESTRAS DE SALIVA NO ESTIMULADA.....	67
4.1.1. RESULTADOS OBTENIDOS TRAS ESTUDIO DE PCR Y GEL DE AGAROSA AL 1%.....	67
4.1.2. RESULTADOS OBTENIDOS TRAS ANÁLISIS Y PIROSECUENCIACIÓN.....	74
4.1.3. CURVAS DE RAREFRACCIÓN.....	90
4.2. ESTUDIO EN MUESTRAS DE SALIVA ESTIMULADA-NO ESTIMULADA.....	93
4.2.1 RESULTADOS OBTENIDOS TRAS ANÁLISIS Y PIROSECUENCIACIÓN.....	93
4.2.2. CURVAS DE RAREFRACCION.....	100
4.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	103
4.3.1. SALIVA NO ESTIMULADA.....	103
4.3.2. SALIVA ESTIMULADA VS NO ESTIMULADA.....	109
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
5.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.....	117
5.2.- ESTUDIO MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN DE SALIVA NO ESTIMULADA.....	118
5.3.- ESTUDIO MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN DE SALIVA ESTIMULADA-NO ESTIMULADA.....	121
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>127</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>131</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>141</b>
8.1. EQUIPOS DE EXPLORACIÓN.....	143

## 1. INTRODUCCIÓN

8.2. MODELOS DE CARTAS INFORMATIVAS UTILIZADAS.....	147
8.3. MODELO DE FICHA DE EXPLORACIÓN UTILIZADA.....	155
8.4. EJEMPLOS ICDAS II.....	159

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.- INTRODUCCIÓN

Caries y enfermedades periodontales son las dos patologías orales con mayor prevalencia. Existen una serie de consideraciones especiales a tener en cuenta al hablar de estas enfermedades.

- Guardan una fuerte relación con la edad, pues a menudo aumenta la intensidad y la prevalencia.
- Existen en todas las poblaciones, variando sólo su gravedad y prevalencia.
- Una de las enfermedades, la caries dental, es irreversible y por ello la información sobre el estado actual proporciona datos no sólo respecto a la importancia de la enfermedad existente sino también a la enfermedad anterior.
- Existe amplia documentación sobre la variación de los perfiles de la caries dental en grupos de población de distintos niveles socioeconómicos y condiciones ambientales.
- Se efectúan numerosas observaciones con mediciones normalizadas para cada sujeto, esto es, para cada diente (o sus respectivas superficies) en el caso de la caries y para los seis sextantes de la boca en la evaluación periodontal.

Los importantes cambios de política sanitaria en salud dental, principalmente orientados a la población infantil, obligan a profundizar en el conocimiento del estado de salud de las enfermedades orales.

Además, debido al fuerte fenómeno de la inmigración que se ha dado en nuestro país en los últimos años y también en la Comunidad Valenciana es necesario realizar encuestas de salud oral ya que muchos de los inmigrantes proceden de países con altos índices de caries y un estado periodontal deficiente. La caries dental es una enfermedad que presentaba una tendencia a disminuir en nuestro país. Pero, ante la llegada de población inmigrante se ha observado una variación de los índices de caries e índices periodontales. Ello implica cambios importantes en el estado de salud de la población y hace que sea necesario evaluarlos para poder adaptar los servicios de salud a esta nueva situación.

### 1.1.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las encuestas sobre salud bucodental en una determinada población tienen por objetivo recoger los datos sobre salud bucodental y necesidades de tratamiento, datos imprescindibles para la planificación y gestión de los programas de cuidados orales.

Tienen como función básica proporcionar una idea de conjunto sobre salud y necesidades de tratamiento poblacional con el fin de vigilar la evolución de las tasas de morbilidad. Nos permiten conocer:

- La medida en que los servicios odontológicos existentes responden a las necesidades de la población.
- Los recursos necesarios para implantar, mantener, aumentar o reducir los programas de salud bucodental, estimando las necesidades cuantitativas y el tipo de personal requerido.

La epidemiología es el estudio de la distribución (patrón) y determinantes (factores) de estados o eventos relacionados con la salud de una población humana determinada y la aplicación de los hallazgos para el control de los problemas de salud. Se trata, en definitiva, de monitorizar las tendencias en el estado de salud de la población estudiada.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda la realización de las encuestas de salud oral periódicas con objeto de monitorizar la evolución del nivel de salud oral de las poblaciones y analizar los cambios ocurridos. El Consejo General de Dentistas de España ha organizado y financiado las últimas tres encuestas de este tipo a nivel nacional, en 1993, 2000 y 2005. Anteriormente se realizaron otras encuestas nacionales en 1971, 1983 y 1990. En la Comunidad Valenciana se han realizado hasta el momento encuestas en los años 1986, 1991, 1998 y 2004.

Los estudios epidemiológicos de salud bucodental en escolares constituyen un instrumento básico en la planificación de los programas de prevención y de asistencia dental<sup>1</sup>. Conocer la evolución de la salud oral infantil es imprescindible para poder valorar la eficacia de medidas adoptadas y qué nuevas aportaciones deben realizarse en los programas de salud bucodental.

Por otro lado los importantes avances en diagnóstico de etiología bacteriana mediante técnicas de PCR nos han abierto puertas para comprender la etiología multifactorial de la enfermedad. La presencia de las bacterias *Streptococcus Mutans* (S. Mutans) y *Streptococcus Sobrinus* (S. Sobrinus) es considerada como los principales agentes etiológicos en la enfermedad de la caries dental. La prevención de la caries actualmente requiere un nuevo enfoque, consistente en determinar los individuos de alto riesgo, en los cuales las medidas clásicas de prevención como el uso de fluoruros, medidas de higiene dental y dietéticas, selladores de fisuras, etc se han mostrado ineficaces.

Dentro del género *Mutans Streptococci* se encuentran dos especies, *Streptococcus mutans* (serotipos c, e y f) y *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), fuertemente implicados en el inicio de la caries dental en humanos. Recientes estudios epidemiológicos han mostrado que la prevalencia de *Streptococcus sobrinus* se haya más fuertemente asociada a una alta actividad de caries que *Streptococcus mutans* (Hirose et al, 1993; Okada et al, 2002, 2005). Por todo ello se considera que la determinación de estas dos especies en la infancia temprana podría ser importante en la predicción y prevención de la caries dental.

Se ha demostrado que las muestras de saliva pueden ser representativas de la microbiota existente en placa dental y de la tendencia a desarrollar diversas enfermedades orales (Sakamoto et al. 2003, Paju et al. 2009). Por ello, la presencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en muestras de saliva puede ser indicativa de la probabilidad de desarrollar caries. Igualmente, la detección de otro tipo de bacterias cariogénicas que pueden estar asociadas al desarrollo de la caries (Aas et al, 2008) o la detección de bacterias periodontopatógenas en estas muestras puede ser de gran utilidad en el ámbito preventivo y diagnóstico. Por ello, nuestro grupo de investigación desarrolló, en muestras de saliva, la aplicación de PCR (Polimerase Chain Reaction-Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen rRNA-16S con adaptadores de pirosecuenciación para la secuenciación masiva de alto rendimiento. Una vez estuvo el protocolo a punto, se analizaron muestras de saliva para la determinación de la diversidad bacteriana total en dichas muestras, teniendo por tanto acceso a información sobre la presencia de todas las bacterias con potencial cariogénico y periodontopatogénico, entre otros.

### 1.2.- REVISIÓN BIBIOGRÁFICA

#### 1.2.1. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE SALUD BUCODENTAL EN ESPAÑA

El primer estudio sobre prevalencia de enfermedades bucales realizado en España, y de ámbito nacional, fue realizado en 1969 por Gimeno de Sande y publicado en 1971. Su utilidad comparativa es limitada ya que los estudios que se han realizado posteriormente han utilizado una metodología diagnóstica diferente (Gimeno de Sande, 1971).

En el año 1983 se realizó un segundo estudio de ámbito nacional. El Ministerio de Sanidad y Consumo encargó a la OMS un informe sobre la salud bucodental en nuestro país. Los resultados de la encuesta nacional realizada fueron publicados por Cuenca.

En 1990, Sicilia y cols., publicaron el tercer estudio nacional, con trabajo de campo realizado en 1987.

Noguerol y cols, en 1993 realizaron el trabajo de campo del cuarto estudio publicado en 1995 (Noguerol, 1995). En 2000 (Llodrá, 2000) se realiza el quinto estudio y el último estudio de ámbito nacional corresponde al año 2005 (Bravo, 2006), ambos realizados por Bravo y cols., para comparar los resultados con los obtenidos en las anteriores encuestas de 1993 y 2000 (Bravo-Pérez, 2006).

Cabe destacar que desde el estudio realizado en 1993, los criterios de diseño, tamaño muestral y la preparación de los exploradores han sido totalmente idénticos con el fin de facilitar la comparación de los resultados obtenidos.

#### 1.2.2. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE SALUD BUCODENTAL EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

El primer estudio realizado en la Comunidad Valenciana se realizó en el año 1986 para establecer la línea base de partida de la salud buco-dental antes de instaurar el Plan de Salud Buco-dental.

## 1. INTRODUCCIÓN

El segundo estudio se lleva a cabo en 1991 (ESBUD-91), con el fin de determinar la prevalencia y el grado de intensidad de la caries dental, el nivel de higiene y las necesidades de tratamiento en la población infantil de los municipios seleccionados. Por otra parte, también sirvió de base para el estudio de viabilidad de la localización de futuras plantas de fluoración de las aguas potables.

En 1998 se realiza el tercer estudio epidemiológico para evaluar la situación de la población diana del programa de salud buco-dental y valorar las medidas desarrolladas hasta el momento y adaptar las medidas preventivas y de promoción de la salud. En este estudio se vio que los índices de salud bucodental se situaban en niveles bajos y similares a los de otras comunidades (Almerich, 1999).

El último estudio realizado, se corresponde al año 2004 en el que se evalúa la salud bucodental de los escolares de la Comunidad Valenciana y se valora su evolución en el periodo 1998-2004.

### *1.2.3. ENFERMEDADES PERIODONTALES Y CARIES.*

Las dos patologías más prevalentes y habituales en la cavidad oral son la enfermedad de caries y el grupo de enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis).

La caries continúa situándose en España entre las enfermedades más prevalentes. Pese a esta alta prevalencia, el índice CAO. D a los 12 años se sitúa en niveles muy bajos, según la clasificación de la OMS, habiéndose conseguido disminuir la gravedad de la patología en las edades infantiles, situando a España, dentro del grupo minoritario de países con índice CAO.D muy bajo (1.33).

<b>ICAO.D 12 años</b>	<b>Nivel de severidad</b>
0 - 1.1	Muy bajo
1.2 - 2.6	Bajo
2.7 - 4.4	Moderado
4.5 - 6.5	Alto
>6.5	Muy alto

Tabla 1: Criterio OMS para clasificar la severidad de ICAO.D a los 12 años

### 1.3.- CARIES DENTAL

La caries es una enfermedad infecciosa que se manifiesta por la desmineralización de los tejidos dentarios (lesión de caries) debido a los ataques ácidos producidos por el metabolismo bacteriano (bajadas del pH bucal). A esta enfermedad se le atribuye una etiología multifactorial. Según el esquema clásico de Keyes (1960), los elementos básicos que intervienen en el proceso de caries son: las características del individuo, la placa bacteriana cariogénica (biofilm), y el sustrato presente en el medio bucal (dieta, saliva, etc.) en el tiempo para ejercer la enfermedad. El conjunto de estos elementos forma un sistema que debe mantenerse equilibrado y que, al desequilibrarse, determina la aparición de la caries dental. Se inicia con una desmineralización del tejido dental, reversible en sus estadios iniciales, que puede provocar su destrucción con la consecuente aparición de la lesión de caries.

Una tendencia actual para entender el desarrollo de la caries es la expresada en la hipótesis ecológica de la placa dental, que implica que la enfermedad es consecuencia de cambios en el equilibrio de la microflora oral residente en la placa dental. Bacterias potencialmente cariogénicas pueden estar presentes en pacientes sanos, pero sin niveles clínicos relevantes. De vez en cuando, un cambio sustancial en el hábitat puede causar un desajuste en los mecanismos homeostáticos microbianos, alterando el equilibrio de la microflora residente habitual. Consecuentemente, hay un cambio hacia una comunidad dominada por bacterias gram positivas con propiedades acidogénicas (pueden absorber y metabolizar carbohidratos, con la producción concomitante de ácido láctico) que erosionan la dentina, y ácido-tolerantes (como *S. mutans* y *S. sobrinus*, que son capaces de habitar en medios ácidos), provocando un descenso del pH y por lo tanto más nichos para microorganismos cariogénicos, que inicialmente proliferan pero posteriormente, reducen la complejidad de la comunidad microbiana de la placa dental (Jiang, 2010) .

Estudios recientes basados en el análisis del DNA bacteriano han confirmado la asociación de *S. Mutans* y *Lactobacillus* con la caries dental en la población infantil, aunque estas especies no son suficientes para explicar todos los casos de caries. No se conocen las características de las comunidades bacterianas en condiciones de salud,

incluida la importancia de las especies que producen compuestos básicos que disminuyen el pH y especies que metabolizan el ácido láctico en ácidos con menor pKa (Gross y cols, 2010).

En un estudio realizado por Gross y cols (2010), tomando muestras de placa dental de esmalte sano en pacientes sin caries (18 individuos), y esmalte sano, mancha blanca, lesiones cavitadas y dentina careada de pacientes con caries dental (21 individuos) se observó que la diversidad bacteriana disminuía a medida que la caries progresaba desde las zonas sanas a lesiones cavitadas y más profundas en dentina. La microbiota varía de unos individuos a otros a medida que la caries progresa: algunos presentan elevados niveles de *Lactobacillus*, otros *S. mutans*, otros ambos y en algunos, ninguno de los dos tipos. Los niveles de *S. Mutans* eran elevados en muchos sujetos sanos, coincidiendo con otros estudios que han demostrado la baja especificidad de *S. Mutans* como predictor de caries. El porcentaje de *S. Mutans* era mayor en los biofilm de la mancha blanca, incluso mayor que en las lesiones cavitadas, lo que correlaciona su papel clave reconocido en la etiología de la caries. No obstante, sus niveles eran menores en lesiones en dentina que en lesiones cavitadas. En las lesiones de mancha blanca, Becker y cols (2002) observaron elevados niveles en placa dental de *Actinomyces gerencseriae* y *A. viscosus*, sugiriendo su papel iniciador de la lesión cariosa; y Aas y cols (2008) observaron además *Streptococcus no-mutans* en estadios iniciales de la caries. Por otro lado, las especies de *Lactobacillus* más comúnmente aisladas en el estudio de Gross (2010) fueron *L. gasseri-L.johnsonii* y *L.casei-L.paracasei*; los niveles de *Lactobacillus* incrementaban a medida que la caries progresaba, se caracterizan por ser acidogénicas-acidoúricas y se encuentran solo en pacientes con caries, raramente en zonas sanas de estos pacientes, lo que indica su papel en la progresión de la caries. En cambio, en lesiones cavitadas, los niveles tanto de *S.mutans* como de *Lactobacillus* aumentan; y para muchos individuos, en dentina, los niveles de *S.mutans* disminuyen mientras que los de *Lactobacillus* aumentan. Una explicación de este fenómeno sería por la débil adherencia de los *lactobacillus*, los cuáles dependen de *S.mutans* y otras especies productoras de ácido para iniciar la caries que es su nicho ideal. Becker y cols (2002) observaron *Bifidobacterium* en lesiones cavitadas y profundas en dentina como el patógeno más numeroso, proponiendo su papel en la progresión de la caries. Aas y cols (2008) observaron en lesiones bancas y dentinarias elevados niveles de *S. parasanguinis* y *S.salivarius* en ambas denticiones; y en lesiones profundas en dentina dominaban

## 1. INTRODUCCIÓN

*S.mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Propionobacterium sp FMA 5* y *Atopobium genomospecies C1* en dentición permanente y en dentición temporal, *Bifidobacterium spp.* También se ha observado que los lactobacillus tienen propiedades antimicrobianas que pueden inhibir el crecimiento de *S. mutans*. (Simark-Mattson y cols, 2007; Strahinic y cols, 2007).

Existen otras especies productoras de ácido láctico en medios con pH bajo y han sido observados elevados niveles de especies productoras de ácido en el estudio de Gross y cols (2010), como *Selenomonas*, *Neisseria* y *Streptococcus mitis*, los cuáles suele aparecer en aquellos individuos dónde no se observan *Lactobacillus* ni *S.mutans*. Las implicaciones cariogénicas de estas especies son: *Neisseria* es capaz de metabolizar glucosa, producir ácidos orgánicos y utilizar ácido láctico, estas actividades dependen de las condiciones de crecimiento; *Selenomonas* están implicadas en caries radiculares de pacientes ancianos y caries coronales de pacientes jóvenes, son capaces de fermentar glucosa y utilizar ácido láctico, sugiriendo su papel en la progresión de la caries; *Streptococcus mitis* puede producir amoníaco e incrementar el pH, son capaces de producir ácido rápidamente incluso a bajo pH, lo que determinaría su papel en la enfermedad, aunque elevados niveles de *S.mitis* están relacionados con estados de salud.

Otras especies menos frecuentemente asociadas con la caries dental son *Veillonella*, la cuál no se encontró relación significativa con el estado de caries en el estudio de Gross (2010), pero está asociada con caries en población infantil y en combinación con *S.mutans* y *V.alcalescens* producen más ácido que otras especies por sí solas; y *Propionobacterium FMA5* que se observó solamente en lesiones avanzadas, puede metabolizar azúcares y su sustrato preferido es el lactato, aunque se encontró en bajos niveles. Estas dos especies incrementan la producción de ácido por otras especies cuando están presentes. La última especie relacionada fue *Campylobacter*, que al igual que *Veillonella* y *Propionobacterium*, utiliza ácidos orgánicos como fuente de energía y contribuye en la caries como sumidero de ácido. Kanasi y cols (2010) también encontraron relación entre *Veillonella* y *Granulicatella elegans* en un estudio realizado en niños sanos y con caries severas.

Se ha sugerido la existencia de bacterias asociadas a salud o protectoras de la caries, ya que sus niveles disminuyen a medida que la caries progresa. Algunas de éstas son

## 1. INTRODUCCIÓN

*Streptococcus mitis*-*S.pneumoniae*-*S.infantis*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus cristatus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eubacterium IR009*, *Campylobacter rectus* y *Lachnospiraceae sp C1* (Gross, 2010). Kanasi y cols (2010) observaron que la microbiota de los niños sin caries estaba asociada con elevadas proporciones de *C. gingivalis*, *Abiotrophia defectiva*, *s. cristatus*, *S. sanguinis* y *Lachnospiraceae sp. HOT-100* clones; así como la colonización por *S. sanguinis* previo a *S.mutans* supone un retraso en la infección por *S.mutans* y en la detección de caries.

En la actualidad no existe duda sobre los efectos beneficiosos del flúor para la prevención de la caries dental. Cuando el flúor se halla presente en la saliva y la placa, tiene un efecto bactericida a altas concentraciones, efecto de aumento de resistencia del diente ante el ataque ácido y efecto remineralizador que permite frenar las reacciones de desmineralización que se producen en la superficie del esmalte y, además, acelerar la remineralización de las pequeñas lesiones incipientes de caries. Las reacciones de desmineralización/ remineralización se suceden de forma continua en la superficie del esmalte. Cuando la fase de desmineralización se prolonga excesivamente y de forma repetitiva por la concurrencia de otros factores de riesgo o por el fallo de mecanismos de defensa aparece la lesión de caries.

Por otra parte, el papel de la dieta como factor etiológico de la caries dental ha quedado bien establecido y la evidencia acerca del papel de consumo frecuente de hidratos de carbono simples es concluyente. Los hidratos de carbono y más especialmente los azúcares, interaccionan con la placa bacteriana sobre el esmalte dental y se produce la liberación de ácidos que desmineralizan el esmalte dentario al provocar una disminución brusca del pH normal de la saliva. Los alimentos con más potencial cariogénico son los que contienen azúcares refinados pegajosos, teniendo en cuenta, que la frecuencia de la ingesta es más determinante que la cantidad, sobre todo si se consumen entre comidas tal y como se observó en el estudio de Vipeholm en 1954. Cabe mencionar el efecto cariogénico de las bebidas refrescantes y algunos zumos de fruta que bebidos con mucha frecuencia y sin estar acompañados de medidas higiénicas adecuadas pueden facilitar la aparición de lesiones de caries. Debido al papel que ejercen los azúcares en el desarrollo de la caries dental se ha sugerido recientemente, un cambio en la cantidad de azúcares extrínsecos para prevenir la caries. De esta manera se

estableció la cantidad de 60 gramos por persona y día para adolescentes y adultos y de 30 gramos para niños y preescolares sin exceder una frecuencia de consumo de 4 veces al día.

Así pues, además del mantenimiento de una adecuada salud oral, las medidas preventivas van dirigidas también, por una parte a remineralizar el esmalte a través del flúor y por otra a disminuir la ingesta de alimentos azucarados regulando los hábitos dietéticos.

### *1.3.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE LA CARIES DENTAL*

Si se analizan los datos de las últimas encuestas nacionales, con respecto a la prevalencia de caries en dentición temporal, las cifras son totalmente superponibles para las tres encuestas de 1993, 2000 y 2005 en el grupo de 5-6 años de edad (38% en 1993, 33% en 2000 y 36% en 2005). En relación a la prevalencia de caries en dentición permanente y para todas las cohortes etarias, las cifras de las dos últimas encuestas nacionales (2000 y 2005) son superponibles. En las edades infantiles y referido a la dentición permanente, se produjo una disminución importante de la prevalencia de caries, pasando del 68% (1993) al 43% en el año 2000. Ello indica que en tan sólo 7 años la prevalencia de caries en dentición permanente en las cohortes infanto-juveniles se ha reducido muy considerablemente. Actualmente esta cifra está estabilizada en torno al 47% en el grupo de 12 años. La situación es muy similar para el grupo de 15 años. El CAO.D a los 5-6 años en el periodo 1993-2005 está estabilizado en valores comprendidos entre 0,97- 1,23 sin que existan diferencias significativas entre los valores. El CAO.D actual a los 12 años (1,33) nos sitúa en niveles bajos de caries según los criterios de la OMS, mientras que el índice de la encuesta del 2000 (1,12) nos situaba en niveles muy bajos. Por lo tanto, después de una reducción del índice CAO.D a los 12 años en el periodo 1993-2000, en este último periodo analizado (2000-2005) asistimos a una estabilización del CAO.D, situando a España entre aquellos países que han alcanzado un CAOD cercano al valor 1. En todos los demás grupos de edad se asiste al mismo fenómeno: disminución en el intervalo 1993-2000 y estabilización en el periodo 2000-2005.

En conclusión, en el periodo 2000-2005 se ha producido una estabilización de la caries en todas las edades analizadas. Los esfuerzos frente a la caries dental deben continuar dirigiéndose a la prevención y tratamiento en las edades infanto-juveniles. Las políticas desarrolladas en numerosas Comunidades Autónomas van en esa línea de actuación.

<b>Estudios nacionales</b>	<b>Edad</b>	<b>ICAO.D</b>	<b>Prevalencia caries permanente</b>	<b>Ico.d</b>	<b>Prevalencia de caries temporal</b>
Estudio 1993	5 - 6	0.04	3,10%	1.02	37,97%
	12	2.32	68,33%		
Estudio 2000	5 - 6	0.07	3,7%	1.06	33,3%
	12	1.12	43,3%		
Estudio 2005	5 - 6	0.04	3,5%	1.23	36,3%
	12	1.33	47,2%		

Tabla 2: Resultados de las últimas encuestas de salud nacionales.

Si analizamos los últimos datos obtenidos en la Comunidad Valenciana observamos que la prevalencia de caries en dentición temporal a los 6 años en 2004 se mantiene en niveles similares a los obtenidos en 1998 (32,2% y 32,8% respectivamente). En dentición permanente, la prevalencia de caries a los 12 años disminuye ligeramente (42,5% y 45,9%), y a la edad de 15-16 años se observa una clara mejoría ya que se pasa de un 55,9% en 1998 a un 55,9 en 2004. Para la dentición temporal estos datos son superponibles a los obtenidos en la encuesta nacional del año 2000 (prevalencia de caries en dentición temporal a los 6 años del 33,3%), y a los observados en el estudio de Navarra 2002 (35,4%). El índice co.d a los 6 años ha pasado de 1.0 en 1998 a 1.08 en 2004, este pequeño ascenso también se reflejó en Navarra 2002 y se atribuye a la influencia de la población inmigrante. En cuanto a la dentición permanente, a la edad de 12 años la prevalencia de caries también es similar a la observada en España 2000 y a la de Navarra en 2002. La marcada tendencia descendente del ICAO.D a los 12 años se ha frenado en el periodo 1998-2004 donde el índice apenas se ha movido, pasando de 1.08 a 1.07. En el último estudio realizado en Canarias en 2006 la prevalencia de caries en dentición permanente fue de 51,9% a los 12 años y a los 14 años de 56,5% y el índice CAO.D obtuvo una cifra de de 1.51 a los 12 años y 2.13 a los 14 años. El efecto de la

inmigración en los índices de caries en la dentición permanente es capaz de elevar entre una y dos décimas los índices CAO.D a la edad de 12 y 15 años, debido a los altos índices que presentan a pesar de representar entre el 6-7% de la muestra total.

<b>Estudios C. Valenciana</b>	<b>Edad</b>	<b>ICAO.D</b>	<b>Prevalencia caries permanentes</b>	<b>Ico.d</b>	<b>Prevalencia caries temporales</b>
1986	6	0.32	12,9%	1.80	52,1%
	12	2.53	70,2%	0.34	18,2%
1991	6	0.02- 0.26	0%-24,33%	0.22- 2.00	10%-43,9%
	12	0.75- 2.85	37,78%-80,36%	0.14- 0.41	6,9%-23,21%
1998	6	0.06	5%	1.00	32,8%
	12	1.08	45,91%	0.25	14,01%
2004	6	0.053	3,7%	1.08	32,2%
	12	1.07	42,5%	0.19	11,5%

Tabla 3: Resultados de las encuestas realizadas en la Comunidad Valenciana.

### 1.3.2- CARIES y PIROSECUENCIACIÓN

La caries dental es una de las enfermedades más comunes en los niños. Esta enfermedad se desarrolla tanto en la corona dental como en la raíz de los dientes, y puede desarrollarse de forma agresiva afectando los dientes primarios en niños y neonatos. El riesgo de caries incluye factores físicos, biológicos, ambientales, comportamentales, y de estilo de vida tales como número elevado de bacterias cariogénicas, flujo salival inadecuado, insuficiente exposición al flúor, pobre higiene oral, métodos de alimentación inadecuados, y pobreza. La placa dental, un complejo biofilm microbiano altamente organizado y estructurado, es imprescindible para la formación de caries dental.

Existen tres hipótesis sobre la etiología de la caries dental: hipótesis específica de la placa dental, hipótesis no específica de la placa dental, e hipótesis ecológica de la placa.

Varios estudios han demostrado que la caries dental puede ser causada por comunidades microbianas altamente patogénicas más que un solo patógeno.

La familia *Mutans Streptococci* (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) están íntimamente relacionados con el desarrollo de la caries dental en el ser humano. Estas bacterias son los patógenos más comúnmente aislados de la placa dental y su prevalencia ha sido demostrada en varios estudios epidemiológicos (Hamada y cols, 1980; Whiley y cols, 1998).

Los primeros métodos de diferenciación entre estas especies cariogénicas se han basado en su morfología de colonización en mitis-salivarius (MS) o Agar MS-Bacitracina. Sin embargo, este método convencional es, a veces, impreciso, además de que consume mucho tiempo y es laborioso. Por otro lado, ha sido demostrado que el medio MS-bacitracina inhibe el crecimiento de *Streptococcus sobrinus* favoreciendo la extensión en éste del *Streptococcus mutans*. Por ello, es de gran importancia distinguir la presencia de estas dos especies de forma separada para conseguir diagnóstico preciso y una prevención efectiva de la caries dental en los niños.

Varios métodos han sido descritos para la detección de los patógenos orales, incluyendo microscopía directa, cultivos, tests enzimáticos, ensayos enzimáticos inmunoabsorbentes y pruebas de ADN específicas de especies.

Actualmente, es aceptado que la metodología de PCR es un medio más sensible de detección de las bacterias propuestas, al compararse con las técnicas de cultivo convencionales, es capaz de detectar números inferiores de bacterias a 25-100 células (Igarashi y cols 1996, 2000), es rápido y relativamente simple de utilizar. Además, los estudios con PCR se ajustan perfectamente a la detección e identificación de las bacterias cariogénicas humanas, como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) con los primers específicos puede proporcionar un método sensible y exacto para la detección y cuantificación de especies individuales y poblaciones bacterianas así como el total de bacterias. En qRT-PCR, la amplificación, medida y cuantificación de los productos de la PCR ocurren simultáneamente en el mismo tubo de reacción. Además, no es necesario realizar

## 1. INTRODUCCIÓN

manipulación post-PCR y el riesgo de contaminación del producto remanente de la PCR se minimiza y las muestras permanecen estables durante largos períodos en frío. QRT-PCR tiene un rango dinámico muy grande de la determinación del objetivo de molécula ya que la medición en tiempo real del producto de PCR permite cuantificar los productos amplificados en la fase de registro de la reacción. (Choi y cols, 2008).

QRT-PCR combina la PCR Standard con el uso de marcadores fluorescentes para medir la cantidad de DNA bacteriano amplificado por PCR durante la fase de amplificación exponencial, por ello, esta técnica proporciona resultados mucho más precisos, exactos y fiables comparados con la PCR convencional. Desde su introducción a mediados de los años 90, qPCR ha incrementado su uso en el estudio de la microflora oral. Psoter y cols (2010) detectaron niveles mayores de *Streptococcus Mutans* y *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* mediante qPCR que con PCR convencional (67'3% y 85'1% con qPCR, respectivamente; y 38'8% y 44'0% con PCR convencional, respectivamente), por lo que este método debería ser considerado para estudios epidemiológicos orales.

La utilización del método qPCR con posterior pirosecuenciación es debido a recientes estudios en metagenómica han demostrado que los microorganismos asociados con el cuerpo humano son aproximadamente, diez veces más numerosos que nuestras propias células y que contienen cien veces más genes. Algunos microorganismos causan enfermedad, aunque la mayoría de ellos son inocuos o juegan un papel importante en los procesos fisiológicos humanos, incluido la respuesta inmune, la digestión y la creación de vitaminas. En la cavidad oral, existen gran número de bacterias que desempeñan un papel importante en la salud general, algunos de ellos están asociados con enfermedades sistémicas tales como la endocarditis bacteriana, la neumonía, el nacimientos de niños con bajo peso, y enfermedades coronarias.

Las técnicas rutinarias de clonación y secuenciación consumen mucho tiempo, son muy laboriosas y solo detectan los miembros predominantes de la comunidad estudiada. En el estudio realizado por Zongxin et al (2010) se compara el análisis de microorganismos orales en saliva y placa bacteriana mediante PCR convencional y las nuevas técnicas de pirosecuenciación observando que con PCR solo se detectan los microorganismos predominantes (*Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Thiomonas*,

*Veillonella*, *Atopobium*, *Rothia*, *Actinomyces* y *Lautropia*) mientras que el análisis con pirosecuenciación reveló mayor número de comunidades bacterianas, hasta 41.905 filotipos reconocidos mediante esta técnica metagenómica que no han sido revelados con la PCR convencional.

Más recientemente, la diversidad bacteriana en los adultos sanos fue examinada con nuevas técnicas de pirosecuenciación demostrando la presencia de la mayor complejidad en los genotipos bacterianos estudiados hasta la fecha. Las mejoras en la pirosecuenciación han permitido un crecimiento dramático en el análisis de muestras numerosas con procesamientos más limitados y de menor coste. Sin embargo, la medida global de la diversidad bacteriana en las diferentes enfermedades orales no ha sido estudiada ampliamente.

La pirosecuenciación con el gen 16sRNA para cepas bacterianas orales permite obtener mayor número de datos y con mayor sensibilidad que con la PCR tradicional. Este tipo de análisis de muestras ofrece una metodología rápida, económica, automatizada y depurada para conocer de manera más sensible la variedad microbiológica de la cavidad oral. Permite un enfoque de alto rendimiento y alta profundidad en el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA y explorar la diversidad en los diferentes microhábitats, por lo que puede ser usado en la detección de poblaciones minoritarias en la microflora oral.

Keijser y cols (2008) estimaron la variedad y riqueza de las distintas especies de la microflora oral de pacientes adultos sanos y determinaron los diferentes filotipos y su abundancia en saliva y placa supragingival mediante pirosecuenciación. Tres géneros constituían el 50 % de la microflora salivar (*Streptococcus*, *Veillonella* y *Prevotella*, siendo este último el más diverso), mientras que en placa supragingival, el 50 % de todas las secuencias era de 6 géneros (*Veillonella*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Rothia* y *Streptococcus*, siendo éste el género más diverso).

### 1.3.3- CARIES y MUTANS STREPTOCOCCI.

Desde que se conoce que la caries dental es una enfermedad infecciosa, los tests para los biomarcadores microbianos de caries pueden ayudar a la identificación de los niños con

alto riesgo de caries y con mayores necesidades de cuidado y tratamiento.

Los primeros patógenos asociados con la caries dental son *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus Sobrinus*, los llamados Mutans Streptococci. Otras especies asociadas a caries son los *Streptococcus no-Mutans*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* y especies de *Veillonella* (Van Houte, 1993). Estudios sobre la microbiología de la caries temprana en edad infantil mediante técnicas de cultivo y técnicas moleculares han ampliado el rango de especies detectadas en caries.

*Mutans Streptococci* son los patógenos más comúnmente aislados de la placa bacteriana y considerados los mayores agentes etiológicos de enfermedad de caries. Las cepas de *Streptococcus mutans* han sido clasificadas en 3 serotipos (c, e y f) y la especificidad serológica viene definida por el polisacárido glucosa-ramnosa de la pared bacteriana (Loesche y cols, 1986). Varios estudios epidemiológicos han registrado que *Streptococcus Mutans* es más prevalente que *Streptococcus Sobrinus* en placa dental, pero también se ha mostrado que la prevalencia de *Streptococcus Sobrinus* está más estrechamente relacionada con altos índices de caries (Okada M y cols 2002, 2005). Existen varias hipótesis sobre la posibilidad de la correlación entre la caries dental y la presencia de varias especies de Streptococcus en la cavidad oral. Seki y cols (2006) realizaron un su estudio longitudinal sobre 432 niños de 3-4 años de edad, los cuáles fueron explorados recogiendo placa bacteriana y saliva no estimulada, y tras 6 meses, se repitió dicha exploración a 416 de los 432 iniciales. Proponen como factor de riesgo la presencia de caries en la primera exploración y la presencia de 2 grupos de colonización combinada de Mutans Streptococci (“colonización combinada de varios serotipos de *Streptococcus mutans* (serotipos c, f y e)” y “colonización combinada de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans*”). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) de aumento de caries en dentición primaria en aquellos niños que presentaban colonización combinada de Mutans Streptococci respecto a aquellos sin Streptococcus en las muestras, los que presentaban sólo *Streptococcus sobrinus* y aquellos con un solo serotipo de *Streptococcus mutans*. Parece que la infección combinada esté relacionada con los hábitos dietéticos, incluido el consumo de azúcares, apoyando la teoría ecológica de la caries.

Sin embargo, existen estudios que comparten la teoría de la infección combinada por *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus sobrinus* como un factor importante de desarrollo de caries, como el de Franco e Franco y cols (2007) en el que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia de caries y la infección con ambas especies de streptococcus. En su estudio, no se encontró ningún paciente (42 niños de 5-6 años) con ambas especies de streptococcus en placa bacteriana, mientras que los niños infectados con una sola especie, tanto *Streptococcus Mutans* como *Streptococcus Sobrinus*, presentaban un elevado riesgo de desarrollo de caries.

Además de estas dos especies de Streptococcus, otros han sido propuestos como beneficiosos para la cavidad oral, como el grupo Mitis Streptococci. Estudios epidemiológicos han demostrado que una colonización temprana y elevados niveles de *S. sanguinis* en la cavidad oral se correlacionan significativamente con una colonización tardía por *S. mutans*. De la misma forma, elevados niveles de *S. mutans* generalmente causan bajos niveles de *S. sanguinis*. En un estudio realizado por Jiang (2010) sobre las diferencias entre la placa bacteriana de niños sanos, aquellos susceptibles de caries (CAOS>10) y con niveles de caries moderadas (4<CAOS<6) mediante PCR, observó 23 especies de streptococcus orales, de las cuales *S. sanguinis*, *S. Mitis* y *S. oralis* muestran mayor prevalencia en niños sanos ( $p<0.05$ ), mientras que los niveles de *S. mutans* y *S. sobrinus* no varían mucho entre los 3 grupos.

La gran colonización por *Streptococcus Mutans* es probable que sea consecuencia de un consumo frecuente de carbohidratos fermentables y, la acción simultánea de varias cepas con diferentes potenciales cariogénicos posiblemente aumentaría el riesgo de caries. En el proceso de caries, el consumo frecuente de hidratos de carbono, sobretodo sacarosa, conduce a una sucesión microbiana en el biofilm hacia un incremento del número de bacterias con mayor capacidad acidogénica y propiedades acido-úricas.

Los distintos genotipos de *Streptococcus Mutans* difieren en su habilidad para formar biofilm en un medio rico en sacarosa y resistir al desafío ácido. Lembo y cols (2007) observaron que los genotipos de *Streptococcus Mutans* altamente resistentes al ataque ácido son más prevalentes en niños con caries activas que en niños sanos, lo que explicaría las diferencias en la actividad de caries observadas en los niños infectados por *Streptococcus Mutans*.

Existen genes específicos de Mutans Streptococci que permiten su identificación mediante qPCR, algunos de ellos expresan importantes factores de virulencia como *gtfB* y *gtfU* los cuáles están relacionados con la glucosyltransferasa (Choi y cols, 2008). En cambio, Argimón y Caufiel (2011), no encontraron pruebas de una estructura de la población que podría sugerir una correlación entre el estatus de las caries y la historia evolutiva de los genes *gtfB* o *gtfC*, asociados con la cariogenicidad de *S.mutans*.

Existen estudios que no solo valoran la cantidad de *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus Sobrinus* en saliva y placa dental, sino que valoran la asociación de estas dos especies con otras especies de *Streptococcus* y su papel en el desarrollo de caries. Ge y cols (2008) en un estudio realizado en 14 niños con caries tempranas rampantes y 8 niños sanos observaron que la presencia de *S.mutans* por sí sola puede no ser el único indicador de mayor riesgo de caries, sino que también sugieren que un efecto interactivo de *S.mutans* y *S.sanguinis* puede jugar un papel importante en la experiencia de caries de la población infantil. Otros factores de riesgo de caries que se observaron fueron la combinación de *S. Mutans* y *S. Sobrinus*, que además, aumentan con la edad; la presencia de *S. Mutans* tanto en prevalencia (más niños con caries tempranas rampantes los presentan) como en cantidad de bacteria (los niños con caries tempranas rampantes presentan mayor número de *S.Mutans*) y los niveles totales de streptococci.

La correlación positiva entre caries y la cantidad de bacterias totales cultivables sugiere que otras especies bacterianas pueden también contribuir en el diferente desarrollo de la caries ya que la media de *S. Mutans* en el total de streptococci de la microflora es menor del 5% y la cantidad de *streptococci* es menor del 10% del total de la placa dental. (Thurnheer et al., 2001)

Existen diversos genotipos de *Streptococcus mutans* colonizando la cavidad oral, con características genéticas distintas que determinan su nivel de virulencia. Pieralisi y cols (2010) estudiaron la diversidad genotípica de *Streptococcus mutans* en la placa bacteriana de 28 pre-escolares brasileños con sanos y con caries activa. Estudiaron 140 aislados de *S.mutans* de cada grupo y observaron una fuerte asociación ( $p < 0.001$ ) entre la diversidad genotípica y la experiencia de caries, habiendo más genotipos de *Streptococcus mutans* en el grupo con caries activa que en los sanos. La combinación de

## 1. INTRODUCCIÓN

varios genotipos con distinta virulencia podría incrementar el riesgo de caries; esto podría ser consecuencia del consumo frecuente de carbohidratos fermentables.

El estado de Salud Bucodental está directamente relacionado con los niveles de *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus Sobrinus*, más concretamente con los índices CAO (D) y CAO (S). Hata y cols (2006) detectaron una correlación entre los niveles de *Streptococcus mutans* en el total de placa bacteriana mediante PCR y la prevalencia de caries dental en los pre-escolares japoneses. Las proporciones de *Streptococcus mutans* en el total bacteriano de los incisivos sanos, y sanos y/o obturados eran significativamente inferiores respecto a los careados u obturados, y careados, respectivamente ( $P < 0,01$ ).

Rodis y cols (2009) realizaron un estudio transversal a 399 escolares japoneses con placa bacteriana y el método Cariostat® (test de evaluación de riesgo de caries usado en Japón en estudios clínicos y epidemiológicos). Se basa en los cambios de color del test en función del pH causado por la producción de ácidos de los microorganismos de la placa bacteriana). Observaron una mayor prevalencia de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en el grupo estudiado. *Streptococcus salivarius* es considerado una de las especies de streptococcus más abundantes en la cavidad oral y también se encuentra sobre las superficies dentales, especialmente durante el desarrollo inicial de la placa dental y en consumo repetitivo de sacarosa. Sin embargo, no hay datos que confirmen el rol etiológico de *Streptococcus salivarius* en la caries dental, incluso se sugiere una relación inversa entre la abundancia de *Streptococcus salivarius* y mutans streptococci. Por otro lado, *Streptococcus sobrinus*, junto con *Streptococcus mutans*, ha sido implicado en el inicio de la caries y en un incremento elevado de la misma en sujetos con *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* conjuntamente (Rodis y cols, 2009).

Estudios recientes valoran la prevalencia y relación de otras especies bacterianas con la incidencia y riesgo de caries. Kanasi y cols (2010) en un estudio realizado mediante PCR de la placa bacteriana de incisivos, molares y superficie lingual de 195 niños de 1 a 6 años de edad observaron una asociación positiva entre *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus vaginalis*, *Streptococcus mutans* y

*Streptococcus sobrinus* y caries dental. Por otro lado, algunas especies de lactobacillus como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*, los cuáles son utilizados como prebióticos entéricos en niños y/o tratamientos anticaries, mostraban una asociación negativa con la caries.

### 1.3.4- SALIVA y MUTANS STREPTOCOCCI.

La saliva se toma como elemento a analizar en vez de placa bacteriana porque ésta última no es totalmente fiable en la predicción de la prevalencia de *Mutans Streptococci* respecto a la flora bacteriana oral total debido a la gran variedad de colonias bacterianas entre superficies (Lindquist and Emilson, 1990). Ha sido demostrado que la saliva, al estar en contacto con todos los dientes, refleja mejor la colonización de *Mutans Streptococci* en toda la dentición (Emilson, 1983).

El grado de infección por *Mutans Streptococci* en la cavidad oral puede ser estimado por los niveles salivales de *Mutans Streptococci*, y ha sido sugerida una relación entre los niveles de Mutans Streptococci y el número de genotipos de *Streptococcus Mutans*. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido confirmada en estudios epidemiológicos como el de Lembo y cols (2007) en el cual se tomaban muestras de saliva no estimulada y de placa dental del dorso de la lengua y biofilms de superficies dentales sanas y careadas en niños sanos y con caries activas (10 y 11 individuos, respectivamente) en el que de 31 de 51 genotipos (62,7%) fueron detectados en saliva del total analizado, por lo que no existía una asociación estadísticamente significativa entre el número de genotipos y los niveles de *Mutans Streptococci* en saliva.

Nurelhuda y cols (2010) en su estudio realizado en saliva de escolares sudaneses para determinar la correlación entre la experiencia de caries y la cuantificación de *Streptococcus Mutans* y *Streptococcus Sobrinus* observaron una asociación positiva entre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* aunque con baja correlación respecto a la experiencia de caries. Estos hallazgos sugieren que *Streptococcus Sobrinus* es la bacteria que se asocia con caries activa y puede ser considerada un determinante de experiencia de caries en los escolares sudaneses.

Crielaard y cols (2011) estudiaron la composición entre la microflora oral de muestras salivales de 74 niños de 3 a 18 años desde la dentición temporal a la permanente (la

muestra se dividió en 4 grupos: dentición temporal, dentición mixta temprana, dentición mixta tardía y dentición permanente) y relacionaron el perfil microbiológico con su estado de salud oral. Las cuatro especies dominantes en todos los grupos fueron *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Los pacientes en dentición temporal presentaban mayor proporción de *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria*, *Moraxellaceae*) que *Bacteroidetes*, mientras que en el resto de grupos *Bacteroidetes* eran al menos, tan abundantes como *Proteobacteria*. *Bacteroidetes* (mayoritariamente el género *Prevotella*), *Veillonellaceae sp*, *Spirochaetes* y TM7 aumentaban con la edad, lo que refleja la maduración de la microbiota impulsado por cambios biológicos producidos con la edad. Generalmente, se produce un aumento de patógenos periodontales anaerobios estrictos con la edad, los cuales se encuentran en su mayor abundancia en la edad adulta (*Bacteroidetes*, mayoritariamente el género *Prevotella*), *Spirochaetes* y TM7). Un estado de salud oral libre de caries está asociado significativamente con *Neisseria flavescens* y *Porphyromonas catoniae*, sugiriendo estas especies como marcadores de salud oral. *Porphyromonas catoniae* se asocia negativamente con CAO-S y, en pacientes libres de caries, con bolsas periodontales poco profundas y dientes periodontalmente sanos; además, produce  $\beta$ -lactamasas (enzima que inactiva los antibióticos  $\beta$ -lactámicos) que podría ser un reservorio para genes de resistencia transferibles a otros patógenos (Könönen y cols, 2000) o para permitir a microorganismos comensales habitar la cavidad oral después del consumo de antibióticos y prevenir el sobrecrecimiento de patógenos oportunistas.

### 1.3.5- ENFERMEDAD PERIODONTAL y MUTANS STREPTOCOCCI.

La enfermedad periodontal y la caries dental se han identificado como las enfermedades orales más frecuentes en el ser humano. Ha sido propuesta una relación inversa entre ambas entidades nosológicas con estudios que lo avalan mediante altos niveles de índice periodontal en poblaciones libres de caries. Por otro lado, algunos registran una correlación positiva entre la enfermedad periodontal y el índice CAO de la OMS. Iwano y cols (2010) observaron mayor prevalencia de *Porphyromonas Gingivalis* en los pacientes periodontales sin caries que los periodontalmente sanos con caries; en cambio, *Streptococcus Mutans* era más prevalente en los pacientes con caries, tanto periodontalmente sanos como enfermos, que los pacientes periodontales sin caries. Además, los niveles de *Porphyromonas gingivalis* en saliva disminuían tras el

tratamiento periodontal, mientras que los de *Streptococcus Mutans* aumentaban. Esto sugería una relación inversa entre enfermedad periodontal y caries en términos clínicos y hallazgos bacteriológicos, así como una correlación negativa entre *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.

El conocimiento actual muestra que la microflora asociada con las localizaciones periodontalmente sanas es diferente de la presente en las zonas inflamadas. En las lesiones periodontales se han detectado con mayor frecuencia poblaciones de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forstythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Campylobacter rectus* (Cr) y *Eikenella Corrodens* (Ec). Por otro lado, *Streptococcus mutans* ha sido generalmente aceptado como el principal agente etiológico de la caries dental y elevados niveles de esta bacteria han sido asociados con elevado riesgo de caries (Cortelli y cols, 2009).

Existen varios estudios que relacionan la placa de origen periodontopatogénico con la cariogénica. Cortelli y cols (2009) en un estudio transversal a 156 niños de 6 a 12 años de edad observa que el germen periodontopatogénico más prevalente es *Porphyromonas gingivalis* (99.0%), seguido de *Tannerella forstythia* (58'7%), *Prevotella intermedia* (58'2%), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (41'3%) y *Campylobacter rectus* (40'8%). La prevalencia de *Streptococcus mutans* fue de 71'9%, pero no existen diferencias estadísticamente significativas respecto al índice de hemorragia ni asociación de *Streptococcus mutans* con las bacterias periodontopatógenas pero sí con el índice CAO (D).

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

## 2.-OBJETIVOS

En la realización del presente estudio nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

### 2.1. – *OBJETIVO GENERAL*

- Determinar la composición de la microflora oral en la saliva de una muestra de niños de 12 años de la Comunidad Valenciana.

### 2.2. – *OBJETIVOS ESPECIFICOS*

- Realizar el análisis metagenómico de la microflora oral a partir de muestras salivales mediante pirosecuenciación de productos de PCR del gen 16S rRNA.
- Analizar la relación existente entre los microorganismos orales y la caries dental mediante técnicas de microbiología molecular (pirosecuenciación de productos de PCR del gen 16S rRNA).
- Estudiar la existencia de diferencias en la composición de la microbiota oral y la biodiversidad entre dos métodos de recogida salival (estimulada y no estimulada) de los pacientes estudiados.



## **3. MATERIAL Y MÉTODO**

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

La obtención de muestras de saliva para el presente estudio se llevó a cabo durante el trabajo de campo del estudio epidemiológico de salud oral de los escolares de la Comunidad Valenciana en el año 2010. La realización de este estudio ha sido financiada mediante los proyectos:

- Convocatoria de ayudas para proyectos de investigación en programas de salud, prevención y predicción de la enfermedad, convocadas por la Orden de 21 de diciembre de 2009, de la Conselleria de Sanitat (DOCV núm. 6175, de 30.12.2009) y adjudicadas por la resolución, de este mismo organismo, de 5 de julio de 2010 (DOGV núm. 6319, de 27.07.201).
- Ayudas de la Universitat de València-Vicerectorado de Investigación: Estudio Epidemiológico de Salud Bucodental en la Población Escolar de la Comunidad Valenciana 2010: (UV-INV-AE11-40221) Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.
- El presente estudio ha sido financiado por la Dirección General de Salud Pública de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana, con la concesión del proyecto de investigación “ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE SALUD BUCODENTAL EN LA POBLACION ESCOLAR DE LA COMUNIDAD VALENCIANA – 2010” (016/2010). Investigador principal Dr. José Manuel Almerich Silla.

Los resultados generales del estudio epidemiológico han sido publicados en el informe de salud ESTUDIO DE SALUD BUCODENTAL INFANTIL EN LA COMUNITAT VALENCIANA N° 133.

#### 3.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se procedió a realizar un estudio descriptivo, de tipo transversal o de corte, también llamado de prevalencia. En él se analizaron, mediante una exploración directa, los principales rasgos y variables que definen el estado de salud bucodental dentro de una determinada población y en un momento dado.

Se siguieron, en todo momento, las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la realización de Encuestas de salud bucodental en referencia a los apartados básicos en este tipo de estudios, dichas recomendaciones se refieren a: la determinación de objetivos, planificación, organización, obtención de autorizaciones, formación y evaluación de los examinadores, duplicación de los exámenes, zona y condiciones para el examen, cumplimentación de los formularios de evaluación y análisis de los datos.

#### *3.1.1- SELECCIÓN DE LA MUESTRA.*

La población objeto de nuestro estudio fue la población escolar de la Comunidad Valenciana en su totalidad. La muestra se seleccionó para poder inferir conclusiones fiables para este grupo de población.

##### a) Edad.

Los criterios para la selección de las edades a explorar fueron estrictamente los recomendados por la Organización Mundial de la Salud. Este organismo recomienda los siguientes grupos: 5 años para los dientes primarios, 12 y 15 para los dientes permanentes. No obstante, la OMS también permite la utilización del grupo de los 6 años, dado que en ciertos países se produce el ingreso en la escuela a esta edad, como sucede en el nuestro.

##### b) Tipo de muestreo.

El principal requisito para que un estudio de este tipo sea fiable es que la muestra sea totalmente representativa de la población diana sobre la que se quieren inferir las conclusiones a partir de los datos obtenidos, para ello es necesario la selección aleatoria de un grupo de individuos que representarán, a pequeña escala, y con muy ligeras variaciones debidas al azar, el conjunto de la población objeto del estudio. Una muestra de este tipo se denomina muestra de sesgo controlado.

En nuestro caso, cuando los individuos de una población están organizados en grupos pequeños (aulas), dado que son escolares, el tipo de muestreo más adecuado es el denominado muestreo por conglomerados. Este tipo de muestreo tiene la ventaja de que disminuye el coste y mantiene la precisión de las estimaciones respecto del muestreo aleatorio simple, siempre y cuando los conglomerados sean tan heterogéneos como las variables a estudiar lo sean dentro de la población general.

## c) Tamaño de la muestra.

El tamaño muestral fue determinado basándonos en la prevalencia de la caries en 2004 en los diferentes grupos de edad, para un nivel de confianza del 95% y una precisión del 0.04, con un error del 4%.

Edad	Prevalencia caries en 2004	Tamaño muestra	Precisión
6 años	34%	539	0.04
12 años	48%	600	0.04
15-16 años	56%	592	0.04

El muestreo más adecuado cuando los individuos de una población están organizados en grupos pequeños (aulas), es el denominado muestreo por conglomerados. Se consideraron a las aulas de 1º de primaria, 1º de ESO y 4º de ESO como conglomerados de niños de edades representativas. Este tipo de muestreo disminuye el coste y mantiene la precisión de las estimaciones respecto al muestreo aleatorio simple, siempre que los conglomerados sean tan heterogéneos como las variables a estudiar lo sean dentro de la población general.

Con el fin de hacer más eficiente el muestreo se formó grupos con aquellos centros que tienen menos de 30 niños. El tamaño de estos conglomerados estaba alrededor de los 60 alumnos aunque varía según los centros que agrupamos.

En la Comunidad Valenciana existen 678 centros grandes (con al menos 30 alumnos) en cuanto a primero de primaria y 667 centros pequeños (con menos de 30 alumnos). La mayoría de estos centros pequeños fueron agrupados entre sí o a otros centros del municipio. Con los 187 restantes se formaron 57 conglomerados en función de la distancia entre ellos. En total, para primero de primaria, había 908 conglomerados. En primero de ESO teníamos datos de 701 centros (568 grandes y 133 pequeños) quedando 605 conglomerados. Finalmente, para cuarto de ESO teníamos 685 centros (490 grandes y 195 pequeños) que quedan agrupados en 552 conglomerados.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

A partir de los datos de prevalencia de caries obtenida en el estudio epidemiológico de 2004 en cada una de las edades y del tamaño del conglomerado, se calculó el número de conglomerados a explorar, siempre para una precisión (error de estimación definido por nosotros) del 4% y con una confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ).

Estrato	Población escolar	Tasa Poblacional (prevalencia04)	Tamaño muestral estimado	Número Estimado Conglomerados
1º Primaria	48626	0.342	534.38 → 540	17.81 → 18
1º E.S.O.	51928	0.483	592.72 → 600	19.76 → 20
4º E.S.O.	39064	0.561	582.51 → 600	19.42 → 20
TOTAL	139618	-	-	58

Tras ello se procedió a realizar el muestreo sobre el total de los centros escolares en cada uno de estos estratos utilizando la estrategia de selección con probabilidad proporcional a su tamaño (número de alumnos) para realizar la selección de la unidad primaria (centro escolar o conglomerado). Así pues, en cada estrato, se extrajo un primer número aleatoriamente que ha fijado el primer conglomerado y después se seleccionaron el resto de centros escolares mediante un muestreo sistemático.

#### 3.1.2-EXAMINADORES.

Se emplearon 3 equipos de exploración formados por un examinador y por un anotador todos ellos licenciados en odontología.

- Calibración previa al estudio:

Tal y como apunta el manual de encuestas epidemiológicas de la OMS (4ª edición), para asegurar la fiabilidad y validez de los resultados se realizará una calibración de los exploradores. Si bien los examinadores pueden diferir ligeramente en su evaluación del estado de salud bucodental de los individuos examinados, deben mostrar estrecha concordancia al evaluar el estado de grupos de población. Cuando un equipo efectúa una encuesta epidemiológica, es primordial que los examinadores participantes sean formados de modo que sus evaluaciones clínicas sean coherentes.

#### *3.1.3- AUTORIZACIONES.*

Para poder realizar las exploraciones a los niños se requiere dar previamente la información pormenorizada acerca de ellas a los padres o tutores, que deben dar su consentimiento y firmarlas. Una vez recibidas las autorizaciones firmadas de los padres/tutores procedió a la exploración. Cuando el estudio concluyó, se remitió un informe individualizado a los padres con los hallazgos encontrados.

#### *3.1.4-MATERIAL UTILIZADO.*

Siempre bajo los criterios y recomendaciones de la OMS para Encuestas de Salud Bucodental, el material utilizado para la exploración consistió en una sonda periodontal tipo OMS y un espejo plano intraoral del nº5. En cada exploración se utilizó un par de guantes de látex y mascarillas desechables. Al terminar la jornada de exploración el material se esterilizó en autoclave en la Clínica Odontológica de la Universitat de València. Todas las parejas de exploradores disponían de un número suficiente de formularios y de encuestas-test.

##### a) Recogida de datos.

Todas las exploraciones se realizaron en el propio Centro Educativo seleccionado en cada ocasión, en el lugar designado por el responsable de dicho centro. Los exploradores fueron entrenados para realizar la recogida de datos en las mejores condiciones posibles de iluminación, situación y ergonomía.

El examen se realizó con el niño sentado en una silla con el cuello extendido y el explorador enfrente sentado. Mientras el examinador procedía con la exploración, el anotador rellenó la ficha de exploración.

##### b) Procesamiento de datos y análisis estadístico.

Los datos recogidos en cada formulario fueron almacenados por cada equipo de exploración en una base de datos del programa Acces® de Microsoft® con el mismo formato que en el propio formulario de papel, para facilitar el proceso.

#### *3.1.5-FORMULARIO DE EXPLORACION.*

Por una parte, para el apartado de salud buco-dental general, el formulario presentaba una serie de campos con distintas variables a cumplimentar: identificación, variables socioeconómicas, estado de caries, índice periodontal comunitario, fluorosis dental y ciertos rasgos de las maloclusiones. No era exactamente el formulario OMS de evaluación de la salud bucodental de 1997, pero la mayoría de los campos coincidían exactamente con él, como es el caso de la exploración de la fluorosis, del IPC, del estado de la caries, incluso de las opacidades del esmalte.

La primera parte del cuestionario presentaba unas casillas de cumplimentación absolutamente obligatoria para identificar al sujeto explorado.

#### **3.1.5.1- Criterios diagnósticos de exploración**

##### 3.1.5.2.1.- ESTADO DE CARIES: CRITERIO ICDAS II

El International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II) es un sistema de diagnóstico y evaluación de caries que ha surgido recientemente con la finalidad de consensuar los criterios clínicos de detección de caries.

La exploración se realiza inicialmente con el diente húmedo y posteriormente se deben secar las superficies con aire durante 5 segundos para observar posibles cambios de coloración.

Se exploran:

- Fosas y fisuras.
- Superficies lisas (M y D)
- Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)

En la Tabla 4 se recogen los siete códigos (del 0 al 6) en función de la severidad de la lesión:

<b>CÓDIGO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>0</b>	<b>Sano:</b> tras secar el diente durante 5 segundos. La presencia de hipoplasias, tinciones, atrición, abrasión o erosión se considera “sano” (código 0).
<b>1</b>	<b>Cambio visual inicial en esmalte:</b> en el diente húmedo no se observan cambios de color pero tras secar existe una opacidad o discoloración (lesión blanca o marrón).
<b>2</b>	<b>Cambio distintivo visual en esmalte sin secar:</b> al observar el diente húmedo existe una opacidad (mancha blanca) y/o discoloración marrón.
<b>3</b>	<b>Esmalte fracturado de forma localizada:</b> al secar se observa una pérdida de la estructura del diente pero NO es visible dentina en las paredes o en el suelo de la cavidad (Microcavitación).
<b>4</b>	<b>Sombra oscura de la dentina por debajo del esmalte:</b> se observa sombra de dentina discoloreada a través del esmalte con o sin pérdida de continuidad.
<b>5</b>	<b>Cavidad distintiva con esmalte visible:</b> existe cavitación franca con dentina expuesta.
<b>6</b>	<b>Cavidad extensa con dentina visible:</b> se observa cavidad amplia y profunda con dentina claramente visible en paredes y suelo. Afecta a gran parte del diente y existe posibilidad de afectación pulpar.

Tabla 4: Códigos índice ICDAS II según la severidad de la lesión.

## ICDAS II: CÓDIGOS

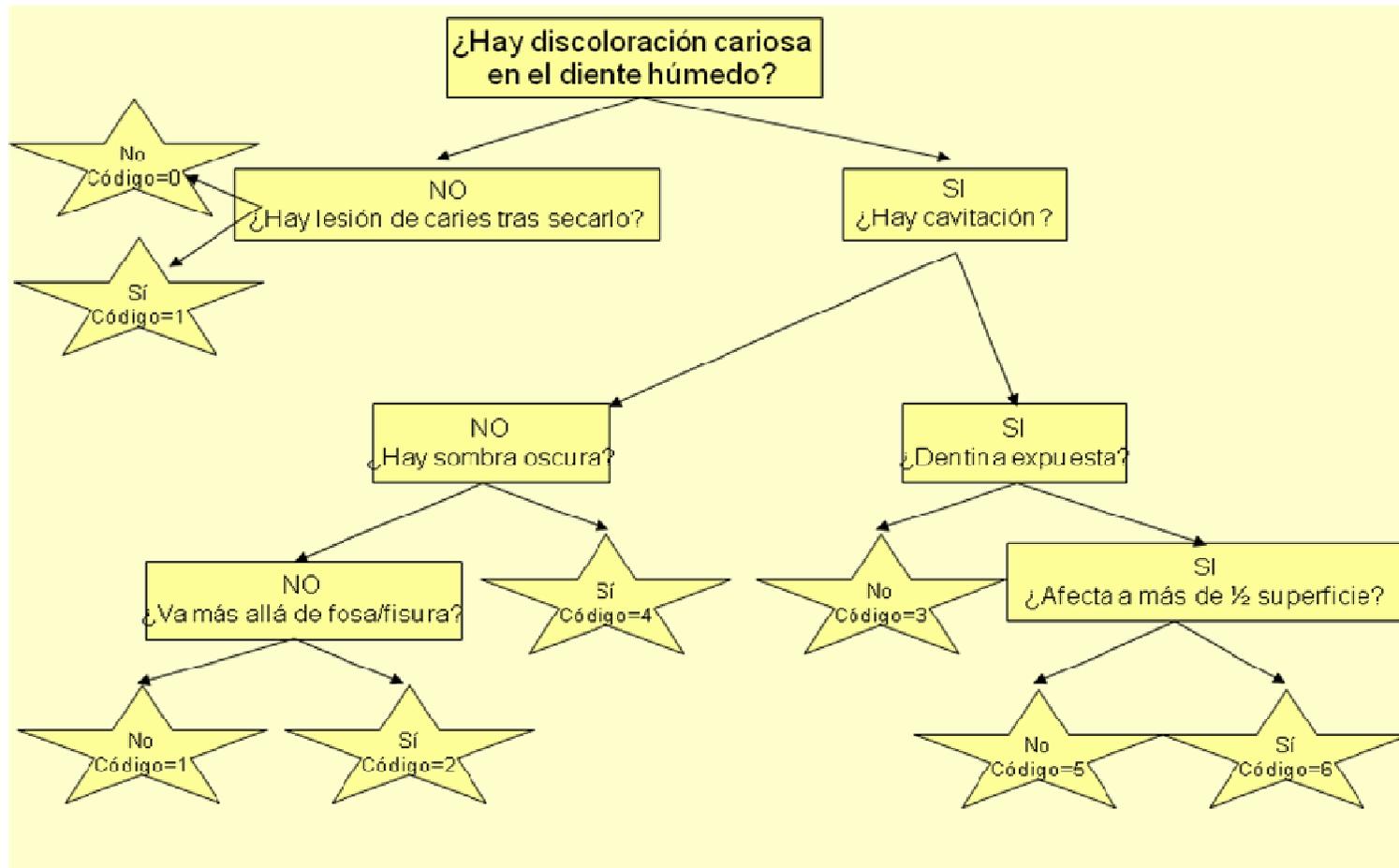


Figura 1: Árbol de decisiones ICDAS II.

## ICDAS II: DOS DÍGITOS

La versión completa del sistema ICDAS incluye la valoración de la presencia de caries, presencia y estado de sellados de fisuras o restauraciones de cualquier tipo. Este registro se compone de dos dígitos:

1<sup>er</sup> dígito: identifica el tipo de restauración/sellado.

2<sup>o</sup> dígito: código de caries (0-6).

Los códigos que clasifican el tipo de restauración o sellado son los siguientes:

<b>CÓDIGO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>0</b>	<b>Sano: sin obturación ni sellado.</b>
<b>1</b>	<b>Sellado parcial.</b>
<b>2</b>	<b>Sellado total.</b>
<b>3</b>	<b>Restauración estética.</b>
<b>4</b>	<b>Amalgama.</b>
<b>5</b>	<b>Corona de acero inoxidable.</b>
<b>6</b>	<b>Veneer o corona de oro, ceramometálica o de porcelana.</b>
<b>7</b>	<b>Restauración rota o perdida.</b>
<b>8</b>	<b>Obturación provisional.</b>
<b>9</b>	<b>Se emplea en las siguientes situaciones:</b>
	<b>96 Superficie no evaluable (se excluye).</b>
	<b>97 Diente ausente por caries.</b>
	<b>98 Diente ausente por otra causa.</b>
	<b>99 Diente no erupcionado.</b>

Tabla 5: Códigos índice ICDAS II según el tipo de restauración o sellado.

#### 3.1.6- PROTOCOLO REALIZADO PARA LA RECOGIDA DE MUESTRA DE SALIVA

a) Recogida de saliva no estimulada:

- Material utilizado: puntas de papel del número 50 estériles (Absorbent paper points ISO color-coded, Dentsply Maillefer, Baillagues, Switzerland), tubos eppendorf estériles (Tubos estériles de 2ml, medidas 40x10.8 mm, tapón a presión, fondo cónico. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf), cajas de corcho para almacenamiento de los tubos eppendorf (soporte estiroporo con tapa, capacidad para 20 vasos, medidas 85x100x65) pinza de boca estéril, hoja de recogida de muestra, rotulador indeleble y nevera portátil.

- Procedimiento:

- Con guantes estériles abrir la caja de las puntas de papel y con la pinza coger dos puntas de papel del número 50 y colocarlas en el suelo de la boca del paciente. Posteriormente el paciente cierra la boca y esperamos un minuto para que la punta de papel esté totalmente empapada de saliva. Vigilar al paciente para que no juegue con las puntas y no se vea alterada la recogida de saliva.
- Recogemos las puntas de papel con la pinza. Previamente abriremos el tubo eppendorf e introduciremos la punta de papel en el interior del tubo con cuidado de no tocar la boca del tubo. El tubo se cierra y se comprueba que esté perfectamente cerrado.
- Anotamos con un rotulador indeleble el código del paciente.
- Anotamos en la hoja de recogida de muestras: fecha de recogida, nombre del paciente y código del mismo.
- Introduciremos el tubo con la muestra en el interior de la caja de corcho correspondiente y ésta en el interior de la nevera portátil hasta que sea guardada en un congelador. Es importante que la muestra no permanezca a temperaturas superiores a 5 grados centígrados.

b) Recogida de saliva estimulada:

- Material utilizado: tabletas de parafina (Paraffin Pellets de Ivoclar Vivadent., Liechtenstein), tubos de recogida de muestras estériles de 15 ml (medidas 76x20 mm, fondo plano y tapón roscado, fondo interior cónico (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorff, Alemania), hoja de recogida de muestras, rotulador indeleble y nevera portátil.

- Procedimiento:

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- Con guantes estériles se entregará a 500 pacientes de forma aleatoria un tubo estéril de recogida de muestras salivales de 15 ml.
- El paciente masticará la tableta de parafina durante 5 minutos y escupirá la saliva formada durante ese tiempo en el tubo estéril. El tubo se cierra y se comprueba que esté perfectamente cerrado.
- Anotamos con un rotulador indeleble el código del paciente.
- Anotamos en la hoja de recogida de muestras: fecha de recogida, nombre del paciente y código del mismo.
- Introduciremos el tubo con la muestra en el interior de la caja de corcho correspondiente y ésta en el interior de la nevera portátil hasta que sea guardada en un congelador. Es importante que la muestra no permanezca a temperaturas superiores a 5 grados centígrados.
- Desechar la tableta de parafina una vez pasados los 5 minutos y haber recogido la muestra.

Las muestras fueron almacenadas en neveras portátiles con elementos mantenedores de frío y transportadas por los equipos de odontólogos hasta los congeladores de la Clínica Odontológica de la Fundación Lluís Alcanyís de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *3.1.7.-PROTOCOLO DE SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA NO ESTIMULADA PARA ESTUDIO CON PIROSECUENCIACIÓN*

Tras la extracción de ADN de las muestras recogidas, se procede a la selección de muestras según el código de caries ICDAS y la edad del paciente.

Los pacientes destinados al análisis mediante pirosecuenciación tienen 12 años de edad durante la exploración bucodental. Se toma esta edad dado que la dentición permanente ya ha emergido y se puede valorar su estado de salud bucodental mediante el índice ICDAS-II.

Los pacientes seleccionados se dividen en 6 grupos:

#### **1.- Grupo 1. Código ICDAS 00 (Libres de caries, sin antecedentes de la enfermedad): cero puro (0 puro).**

1° dígito (0): Sano sin obturación ni sellado. No tiene historia anterior de caries.

2° dígito (0): Aquellos pacientes que tras secar el diente durante 5 segundos, está sano. La presencia de hipoplasias, fluorosis, tinciones, atrición, abrasión o erosión se considera sano.

#### **2.- Grupo 2. Código ICDAS X 0 (Libres de caries actuales, con antecedentes de la enfermedad): cero con antecedentes (0+obts).**

1° dígito (X): 1: Sellado parcial, 2: sellado total, 3: Restauración estética, 4: Amalgama, 5: Corona de acero inoxidable, 6: Veneer o corona de oro, ceramometálica o de porcelana.

2° dígito (0): Aquellos pacientes que tras secar el diente durante 5 segundos, está sano. La presencia de hipoplasias, fluorosis, tinciones, atrición, abrasión o erosión se considera sano.

#### **3.- Grupo 3. Código ICDAS 01 (Paciente con lesiones iniciales de caries sin antecedentes): Lesiones iniciales de caries (código 1 y 2 de ICDAS) sin antecedentes de caries, sin obturaciones (1 puro).**

1° dígito (0): Sano sin obturación ni sellado. No tiene historia anterior de caries.

2° dígito: Incluye códigos 1 ó 2:

- *Código 1: Cambio visual inicial en esmalte:* en el diente húmedo no se observan cambios de color pero tras secar existe una opacidad o discoloración (lesión blanca o marrón).

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- *Código 2: Cambio distintivo visual en esmalte sin secar:* al observar el diente húmedo existe una opacidad (mancha blanca) y/o discoloración marrón

#### **4.- Grupo 4. Código ICDAS X 1 ó 2: Lesiones iniciales de caries (código 1 y 2 de ICDAS) con antecedentes de caries, con obturaciones (Mxbl+obts).**

1° dígito (X): 1: Sellado parcial, 2: sellado total, 3: Restauración estética, 4: Amalgama, 5: Corona de acero inoxidable, 6: Veneer o corona de oro, ceramometálica o de porcelana.

2° dígito: Incluye códigos 1 ó 2:

- *Código 1: Cambio visual inicial en esmalte:* en el diente húmedo no se observan cambios de color pero tras secar existe una opacidad o discoloración (lesión blanca o marrón).
- *Código 2: Cambio distintivo visual en esmalte sin secar:* al observar el diente húmedo existe una opacidad (mancha blanca) y/o discoloración marrón.

#### **5.- Grupo 5. Código ICDAS XY (Paciente con lesiones de caries con pérdida de continuidad con antecedentes). Lesiones cavitadas (códigos 3 a 6 de ICDAS) con antecedentes de caries, con obturaciones (Cav+obts).**

1° dígito (X): 1: Sellado parcial, 2: sellado total, 3: Restauración estética, 4: Amalgama, 5: Corona de acero inoxidable, 6: Veneer o corona de oro, ceramometálica o de porcelana.

2° dígito (Y): Incluye códigos de caries del 3 al 6.

- *Código 3: Esmalte fracturado de forma localizada.* Al secar se observa una pérdida de la estructura del diente pero NO es visible dentina en las paredes o en el suelo de la cavidad (Microcavitación).
- *Código 4: Sombra oscura de la dentina por debajo del esmalte.* Sombra de dentina discoloreada a través de esmalte con o sin pérdida de continuidad.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- *Código 5: Cavityad distintiva con dentina visible.* Cavitación franca con dentina expuesta.
- *Código 6: Cavityad extensa con dentina visible.* Cavityad amplia y profunda con dentina claramente visible en paredes y suelo. Afecta a gran parte del diente y existe posibilidad de afectación pulpar.

**6.- Grupo 6. Código ICDAS 0Y (Paciente con lesiones de caries con pérdida de continuidad sin antecedentes):** Lesiones cavitadas (códigos 3 a 6 de ICDAS) sin antecedentes de caries, sin obturaciones (**Cav sin obts**).

1º dígito (0): Sano (sin obturación ni sellado). No tiene historia anterior de caries.

2º dígito (Y): Incluye códigos de caries del 3 al 6.

- *Código 3: Esmalte fracturado de forma localizada.* Al secar se observa una pérdida de la estructura del diente pero NO es visible dentina en las paredes o en el suelo de la cavityad (Microcavitación).
- *Código 4: Sombra oscura de la dentina por debajo del esmalte.* Sombra de dentina discoloreada a través de esmalte con o sin pérdida de continuidad.
- *Código 5: Cavityad distintiva con dentina visible.* Cavitación franca con dentina expuesta.
- *Código 6: Cavityad extensa con dentina visible.* Cavityad amplia y profunda con dentina claramente visible en paredes y suelo. Afecta a gran parte del diente y existe posibilidad de afectación pulpar.

El número de muestras por grupo tras la división según las características anteriormente descritas son:

- Grupo 1 (00): 46 muestras.
- Grupo 2 (X0): 20 muestras.
- Grupo 3 (01): 50 muestras.

- Grupo 4 (X 1 ó 2): 25 muestras.
- Grupo 5 (XY): 24 muestras.
- Grupo 6 (0Y): 45 muestras.

### 3.1.8.-PROTOCOLO SELECCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA ESTIMULADA PARA ESTUDIO CON PIROSECUENCIACIÓN

#### Selección de pacientes y Toma de muestras

Del grupo de 110 muestras de saliva no estimulada, se seleccionaron 10 individuos de 12 años de edad explorados en la Encuesta de Salud Bucodental de la Comunidad Valenciana del año 2010, ocho de los cuáles presentaban un índice ICDAS II igual 00 (Libres de caries, sin antecedentes de la enfermedad) y los dos restantes con índice ICDAS II X0 (Libres de caries actuales, con antecedentes de la enfermedad). En la tabla 6 se muestran los pacientes seleccionados con las referencias de las muestras de saliva comparadas.

Id	Subgrupo (ICDAS II)	Nº MUESTRA	
		NO EST	EST
0540	00	NO EST 540	EST 540
0544	00	NO EST 544	EST 544
0548	00	NO EST 548	EST 548
0552	00	NO EST 552	EST 552
0557	00	NO EST 557	EST 557
0612	00	NO EST 612	EST 612
0613	00	NO EST 613	EST 613
0618	00	NO EST 618	EST 618
0578	X0	NO EST 578	EST 578
0579	X0	NO EST 579	EST 579

Tabla 6: Pacientes seleccionados para el estudio comparativo entre saliva estimulada y no estimulada.

#### Análisis de los datos

Este estudio se realizó siguiendo los mismos parámetros y protocolos que el resto de las muestras anteriormente descrito. Esta parte del proyecto se realizó para conocer si existían diferencias entre la microbiota oral de la saliva estimulada y no estimulada de

los pacientes tomada en el mismo momento, y poder llegar a un resultado concluyente sobre la representación de dicha microbiota en función de la muestra recogida.

#### *3.1.9-EXTRACCION DEL ADN A PARTIR DE MUESTRAS SALIVALES.*

Previo a la realización de las PCR de las cepas bacterianas a estudiar, es necesario extraer el ADN de las puntas de papel. Se utilizó el kit de extracción de ADN “RTP® Bacteria DNA Mini Kit”, el protocolo para la extracción de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante es el protocolo 4, es el siguiente:

- Colocar la punta de papel en el Tubo de Extracción L.
- Añadir 400 microlitros de Resuspension Buffer R en el tubo de Extracción L y agitarlo levemente.
- Incubar la muestra en un termobloque durante 10 minutos a 37°C y a 65°C durante 10 minutos (agitar la muestras de forma continua incrementa el proceso de lisis, después de 8 minutos es posible conectar el bloque a 65° C y colocar la muestras en él; si el bloque no agita a menos de 4° C por minuto, se debe incubar durante 12 minutos, si el bloque es más lento, se debe incrementar el tiempo de incubación).
- Colocar el tubo de Extracción L en un termobloque e incubar a 95° C durante 5-10 minutos (agitar la muestra de forma continúa incrementa la eficacia de la lisis).
- Después de la lisis, centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 1 minuto para precipitar la punta de papel.
- Transferir el sobrenadante completamente a un tubo de reacción de 1,5 ml.
- Añadir 400 microlitros de Binding Buffer B6 a la muestra y agitar levemente.
- Cargar la muestra en el RTA Spin Filter Set e incubar durante 1 minuto. Centrifugar a 9.300 x g (10.000rpm) en una centrífuga estándar durante 1 minuto. Desechar el filtrado y recolocar el RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
- Añadir 500 microlitros de Wash Buffer I y centrifugar a 9.300 x g (10.000rpm) en una centrífuga estándar durante 1 minuto.
- Desechar el filtrado, y el RTA Receiver Tube.
- Colocar el RTA Spin Filter en un nuevo RTA Receiver Tube.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- Añadir 600 microlitros de Wash Buffer II y centrifugar a  $9.300 \times g$  (10.000rpm) en una centrífuga estándar durante 1 minuto. Desechar el filtrado, recolocar el RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube y centrifugar durante 3 minutos a la máxima velocidad para eliminar el etanol completamente.
- Colocar el RTA Spin Filter en un tubo Receiver de 1,5 ml nuevo y añadir 200 microlitros de Elution Buffer D (cuando se hayan usado una o dos puntas) o añadir 400 microlitros de Elution Buffer D (cuando se hayan usado tres o cuatro puntas), Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 1 minuto a  $5.900 \times g$  (8.000rpm)

El ADN también puede ser diluido con volúmenes inferiores de Elution Buffer D (depende de la producción de ADN bacteriano esperada).

Si se ve un pellet blanco en la elución, se puede centrifugar de nuevo la muestra a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

Una vez se ha extraído el ADN, este se almacenó de forma separada en 2 tubos, uno de ellos con 100 microlitros (el cuál fue almacenado en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública a  $-80^{\circ}C$  para proceder a su estudio con PCR) y los 300 microlitros restantes fueron almacenados en otro tubo en la Clínica Odontológica de la Fundación Lluís Alcanyís de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València a  $-80^{\circ}C$ .

Se decide tomar 20 muestras por cada grupo, las cuáles se seleccionaron en función de la concentración de ADN tras concentrar los 400 microlitros iniciales con el speed-vac, hasta conseguir 45 microlitros por muestra. Las muestras se colocaron en el speed-vac a  $55^{\circ}C$  durante 4-5 horas, según el ritmo de concentración.

Posteriormente, se obtuvo la concentración de ADN por muestra utilizando el Nanodrop®, y se seleccionaron las muestras con mayor concentración de ADN por microlitro. El Nanodrop es un espectrofotómetro capaz de medir la concentración y pureza de muestras ADN, ARN y proteínas, de entre 0,5 y 2,0 microlitros. La sistemática de trabajo consiste en:

- Se abre el programa Nanodrop 2000 y se selecciona la opción: Nucleic Acid.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- Limpieza del lector del Nanodrop con agua destilada: se colocan 1µl sobre el sensor y se baja la tapa. Posteriormente, se selecciona la opción “Blank”. Esta operación se realiza 2 veces, una para limpieza y la siguiente para crear el blanco, o referencia de muestreo sin ADN (limpio).
- Posteriormente, se procede al análisis de cada muestra. Se coloca 1µl de la muestra en el lector cuidadosamente para que no se formen burbujas. Se escribe el número de la muestra y se selecciona la opción “Measure”. Aparece la concentración de ADN (ng, µl), la pureza y la contaminación por proteínas, RNA.
- Así, sucesivamente hasta completar todas las muestras a analizar. Es recomendable realizar un lavado o “re-blank” con agua destilada cada 10 muestras, para asegurar una medición fiable y adecuadamente calibrada.

A partir de este momento, las muestras están preparadas para ser estudiadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa con el gen del 16S (**PCR 16S**).

#### *3.1.10-DETERMINACION DE MICROORGANISMOS ORALES MEDIANTE PCR*

##### Secuencia de preparación de PCR del gen del 16S

- Se tomaron 10 muestras por PCR, las cuales están a -80°C y se dejan a temperatura ambiente para poder tomar 1µl de cada una.
- Se prepara el mix que contiene:

Mix	Volumen	X muestras (13)	Orden
Agua	37'8 µl	491,4 µl	6°
Buffer	5'0 µl	65,0 µl	5°
dNTPs mix	1,0 µl	13,0 µl	3°
MgCl2	3,0 µl	39,0 µl	4°
Primer 1 (533R + adapt)	1,0 µl	13,0 µl	1°

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

Primer 2	1,0 $\mu$ l	13,0 $\mu$ l	2°
Enzima	0,2 $\mu$ l	2,6 $\mu$ l	7°

Tabla 7: Material necesario y proporciones de cada elemento para la preparación de la mezcla para la PCR.

Para preparar el mix, se coloca todo en el mismo tubo, excepto el Primer 2 que será un pimer específico y distinto para cada muestra porque es el adaptador para el pirosecuenciador. Cada uno de estos primers se puede usar en cada octavo de placa del pirosecuenciador, pero sin coincidir en un mismo octavo dos muestras con el mismo primer porque se solaparían y no obtendríamos el análisis de éstas.

Los adaptadores son secuencias de 8 nucleótidos, cada uno distinto de los demás, para diferenciarlos en el análisis mediante pirosecuenciación. Fueron usados los siguientes 40 adaptadores:

Número adaptador(primer)	Secuencia de nucleótidos
01	AACCAACC
02	AACCGGAA
03	AACCTTCC
04	AAGCCGAA
05	AAGCGGAT
06	AAGGTTCC
07	AATACGCC
08	ACACCACA
09	ACATCTCT
10	ACAGACTC
11	ACCAACCA
12	ACCAAGCT
13	ACCTAGGT
14	ACCTTCCA
15	ACGAAGCA
16	ACTCGACA
17	ACTCGAGT
18	ACTGACAC
19	AGACGACA
20	AGAGTCTC
21	AGCACAAG
22	AGCATCGT
23	AGGTACGA
24	AGTCTGTG

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

25	ATAAGGCG
26	ATATCGGC
27	ATCCGGAT
28	ATCGCCAA
29	ATGGATCG
30	ATTAGGCC
31	CAAGACGA
32	CAAGGTTC
33	CACACACA
34	CACTACTC
35	CACTTGAG
36	CACTTGAG
37	CAGAGACA
38	CATGTCCT
99	CCAACGTA
40	CCAAGGAA

Tabla 8: Primers adaptadores para el estudio de pirosecuenciación y secuencia de aminoácidos a la que corresponden.

Se rotulan 12 tubos eppendorf de 10 µl (uno por muestra, uno para el positivo y otro para el negativo). Se coloca el Primer 2 (números....), posteriormente se ponen 1 µl de DNA en cada tubo del paciente correspondiente, y finalmente, 47'8 µl del mix.

Se colocan los 12 tubos en el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos:

94 ° C	94 ° C	52 ° C	68 ° C	68 ° C	8 ° C
2 min	10 min	30 seg	26 seg	7 min	
← 25 ciclos →					

Tabla 9: Programa con los estadíos, temperaturas, tiempos y ciclos de la PCR del gen del 16S.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se procede a cargar el gel de Agarosa. Se coloca Agarosa al 1'4 % en un recipiente rectangular con los peines que forman los pocillos para depositar el producto de PCR con el mix de carga (2,0 µl de Gel Red por cada 100,0 µl de buffer loading x3). Éste se deja enfriándose durante 45 minutos.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

Después, se coloca en una batea con TBE 1X y se retira el peine. La cantidad de TBE 1X debe ser suficiente para cubrir los pocillos y que no queden burbujas.

Se colocan 4,0  $\mu$ l del mix de carga por cada muestra en una gradilla y se mezclan con 4,0  $\mu$ l por muestra. Se cargan estos 8,0  $\mu$ l en cada pocillo dejando libre el 1° y el último para colocar 4,0  $\mu$ l del mix de carga con 1,0  $\mu$ l de ruler de 100 kpb.

Una vez están todos los pocillos llenos, se conecta la batea a la corriente eléctrica con voltaje 120V/700 durante 18 min. Después, se visualiza mediante luz UV y se registra la imagen.

#### Purificación de los productos de PCR

El **proceso de purificación** de productos de PCR se realiza para obtener el ADN de doble cadena que hay en cada muestras, que es lo que el pirosecuenciador analizará permitiendo obtener las secuencias genómicas. Los pasos a seguir son:

1. Tomar una placa para purificación de 96 pocillos, los cuáles poseen una membrana en el fondo a través de la cual se producirá el vacío y dónde quedarán retenidas aquellas moléculas con tamaño superior a 100 kpb.
2. Transferir el producto de PCR de cada muestra a cada pocillo sin tocar la membrana directamente. Cada producto de PCR está en 46-50  $\mu$ l, ya que 4  $\mu$ l fueron usados para hacer la PCR.
3. Rotular tubos de 1,5 ml con el n° original de la muestra. Aquí depositaremos el resultado de la dilución de lo que se obtenga tras el vacío de la placa de purificación añadiendo 35  $\mu$ l de agua purificada.
4. Colocar la placa de purificación en la cámara de vacío Promega® 10 minutos, hasta que no haya nada en el pocillo.
5. Calentar agua a 75°C y 300rpm en el termociclador. Se necesitan 35  $\mu$ l por muestra.
6. Se añaden 35  $\mu$ l de agua en cada pocillo.
7. Colocar la placa de purificación en el termociclador a 50°C, 500 rpm durante 8 minutos.

8. Recuperar la muestra de cada pocillo (35-40  $\mu$ l) y depositarla en los tubos de 1'5 ml rotulados previamente.

#### Medición de ADN con PICOGREEN

El Picogreen es un aparato capaz de medir la concentración del ADN mediante el uso de un colorante fluorescente que se une al ADN de doble cadena (PicoGreen®, Molecular Probes) y su cuantificación en un fluorímetro. Para cada muestra se obtienen medidas para 2 diluciones seriadas. Se ha demostrado que esta técnica es mucho más sensible que la medida de la absorbancia a 260 nm, y que permite detectar hasta 25 pg/ml de DNA.

Para realizar la medición se prepara un mix con 199  $\mu$ l de TE 1X + 1  $\mu$ l de primer fluorescente de picogreen. Estas son las proporciones para 8 muestras. Este preparado debe almacenarse en ausencia de luz para evitar su activación.

Para medir con el picogreen, se rotulan tubos pequeños con el n° de la muestra original y depositar 1  $\mu$ l de la muestra en cada uno. Seguidamente, se colocan 24  $\mu$ l de TE 1X y finalmente, 25  $\mu$ l de la mezcla de picogreen. Una vez preparado cada tubo, deben almacenarse en ausencia de luz durante 3 minutos.

Pasados los 3 minutos, se transfieren los 50  $\mu$ l de cada tubo en una columna transparente específica para picogreen. La columna se coloca dentro de la ranura del picogreen y se procede a medir (Measure Fluorescent DNA2). El valor obtenido se muestra en ng/ $\mu$ l.

Este valor debe ser multiplicado por 50, porque son los microlitros de que disponemos de cada muestra.

#### Preparación de las muestras para pirosecuenciar

Tras medir con el picogreen, ya disponemos de la concentración de DNA en nanogramos por microlitro. Para preparar las muestras para el pirosecuenciador, todas

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

ellas deben estar a la misma concentración, por lo que aplicaremos la siguiente fórmula, obteniendo así la concentración de moléculas por microlitro (molec/ $\mu$ l):

$$\frac{\text{Ng}/\mu\text{l} \times 6'02 \cdot 10^{23}}{656'6 \cdot 10^9 \times 590}$$

Una vez obtenida la concentración en molec/ $\mu$ l, debemos conocer la cantidad de buffer TE 1X que hay que añadir para diluir la muestra y conseguir la misma concentración para todas las que serán analizadas en el mismo tubo:

$$\frac{\text{Molec}/\mu\text{l}}{10^9} \cdot 1 = \mu\text{l de buffer TE 1X}$$

Seguidamente, se preparan tubos pequeños con 1  $\mu$ l de muestra y se añaden tanto  $\mu$ l de buffer TE 1X como hayamos calculado según la fórmula anterior.

Finalmente, transferimos el resultado de cada muestra en un mismo tubo de 1'5 ml, el cuál será analizado en el pirosecuenciador.

En cada tubo contiene entre 20 y 25 muestras para su análisis, para obtener sobre 2000 secuencias por cada una. De este modo, se consiguen entre 40.000 y 50.000 secuencias por tubo. En nuestro estudio, utilizamos 5 tubos con la siguiente distribución:

- RUN 43: estudio preliminar saliva estimulada-no estimulada.

Nº MUESTRA	PRIMER	$\mu$ l (DILUCION)
540	3	35.5
544	4	3.67
548	5	2.11
552	7	2.11
557	10	0.22neg
612	11	6.78
613	12	13.78
618	13	13
578	26	9.1
579	27	5.41
EST 540	14	23.11
EST 544	15	22.33

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

EST 548	16	20.78
EST 552	17	11.44
EST 557	18	33.2
EST 612	19	21.56
EST 613	20	38.67
EST 618	21	23.9
EST 578	22	23.11
EST 579	23	19.2

Tabla 10: Muestras analizadas en el run 43, primer utilizado para la secuenciación del gen del 16S y microlitros necesarios de cada muestra para la dilución de la mezcla para el estudio mediante pirosecuencacion.

- RUN 45: saliva no estimulada (1° octavo de placa)

N° MUESTRA	PRIMER	μl (DILUCION)
317	11	4.44
432	29	1.33
542	32	0,22neg
554	10	0.55
1088	14	24.64
1095	26	2.88
1098	15	19.2
1106	30	0,22neg
1173	16	6.77
1178	33	33.19
1184	38	4.44
1188	17	8.32
1197	39	0,22neg
1221	18	0,22neg
1229	19	1.33
1230	20	4.44
1312	4	7.55
1313	5	19.2
1315	21	16.09
1316	22	23.9
1317	7	9.1
1318	23	17.65
1320	24	13
2010	25	2.11

Tabla 11: Muestras analizadas en el run 45, primer utilizado para la secuenciación del gen del 16S y microlitros necesarios de cada muestra para la dilución de la mezcla para el estudio mediante pirosecuencacion.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- RUN 48: saliva no estimulada (2° octavo de placa)

Nº MUESTRA	PRIMER	µl (DILUCION)
5	25	3.66
21	24	6.77
241	26	5.21
580	28	0.55
581	29	9.1
587	30	0,22neg
610	12	6.77
611	11	1.33
1093	16	0,22neg
1094	17	9.1
1097	31	15.32
1170	22	5.21
1182	18	9.88
1183	32	2.88
1187	34	20.76
1189	35	9.1
1190	37	9.1
1191	38	7.55
1209	33	2.88
1216	3	8.32
1220	27	2.88
1226	40	16.87
2006	15	2.11
2021	19	1.33

Tabla 12: Muestras analizadas en el run 48 (2° octavo de placa), primer utilizado para la secuenciación del gen del 16S y microlitros necesarios de cada muestra para la dilución de la mezcla para el estudio mediante pirosecuencacion.

- RUN 48: saliva no estimulada (3° octavo de placa)

Nº MUESTRA	PRIMER	µl (DILUCION)
1	22	4.44
6	13	3.66
11	28	6
13	30	5.22
20	31	9.88
189	23	11.43
243	6	8.32
315	14	5.22

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

429	12	0,22neg
434	5	1.33
558	25	2.88
1079	15	0,22neg
1080	11	0.55
1084	35	15.32
1085	37	5.22
1096	30	34.7
1162	32	8.32
1163	20	6.77
1169	21	13
1185	19	6
1193	40	7.55
1217	4	18.42
1225	29	0,22neg
2009	16	0,22neg
2017	18	2.11

Tabla 13: Muestras analizadas en el run 48 (3° octavo de placa), primer utilizado para la secuenciación del gen del 16S y microlitros necesarios de cada muestra para la dilución de la mezcla para el estudio mediante pirosecuencacion.

- RUN 53: saliva no estimulada (4° octavo de placa)

<b>N° MUESTRA</b>	<b>PRIMER</b>	<b>µl (DILUCION)</b>
14	3	0.22neg
234	24	4.44
239	16	0.55
430	4	2.11
440	32	1.33
441	21	0.22neg
442	20	1.33
444	22	13.76
447	10	10.65
546	35	0.22neg
559	37	2.11
616	13	0.22neg
620	23	11.43
1081	33	6.77
1082	34	11.43
1086	38	19.97
1103	27	12.98
1160	31	0.55
1196	5	8.32
1203	19	21.53
1231	15	0.55
1314	39	4.44

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

2015	17	0.55
2019	40	1.33

Tabla 14: Muestras analizadas en el run 53, primer utilizado para la secuenciación del gen del 16S y microlitros necesarios de cada muestra para la dilución de la mezcla para el estudio mediante pirosecuencacion.

#### Amplificación del ADN y Pirosecuenciación

Se realizaron amplificaciones por PCR mediante el uso de primers universales modificados del gen 16S rRNA para bacterias (se utilizaron los primers 8-27F y 533R). A estos primers se les añadió previamente los adaptadores A y B del sistema Titanium del pirosecuenciador FLX de 454-Roche, siguiendo McKenna y cols (2008), los cuáles permitieron la unión de los amplicones obtenidos a las microbolas de captura así como su secuenciación. Además, cada muestra se amplificó mediante un primer forward que contenía una secuencia identificativa distinta de 8 pares de bases (pb), de tal manera que esta secuencia pudiera servir de “código de barras” para separar las distintas muestras (Andersson y cols. 2008) por un sencillo programa informático de elaboración propia. Ello permitió mezclar los productos amplificados de varias muestras en una sola reacción de pirosecuenciación, que se llevó a cabo en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (Valencia), mediante el uso de 1/8avos de placa. Cada uno de estos 1/8avo produce por término medio 40,000 secuencias de unas 400 pb de longitud. Por ello, la combinación de 20 muestras por pocillo mezcladas en cantidades equimolares, daban lugar a unas 2,000 secuencias del gen por muestra. Los productos de PCR con los primers modificados se corrieron en gel de agarosa, purificando el ADN con el kit Ultrapure DNA de Roche.

Las secuencias se recogen en tablas de Excel con los siguientes valores:

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- RUN 45: saliva no estimulada (1° octavo de placa)

muestra	total secuencias	seqs después del corte	Long media de seq después del corte	Desviación standar de long de seq	Secuencias eliminadas por			
					primer trimmer	N count	> 250 bp	calidad
317	6232	4837	439	69,75	10	628	757	0
432	7581	5666	431	68,77	1	883	1031	0
554	6835	5119	408	64,28	5	724	987	0
1088	5375	4157	440	70,47	3	599	616	0
1095	6151	4490	409	64,5	2	604	1055	0
1098	9305	7058	429	68,24	4	1042	1201	0
1106	3516	2544	409	65,28	3	453	516	0
1173	7108	5248	427	70,03	8	1138	714	0
1178	5707	4297	420	69,1	8	668	734	0
1184	4370	2652	369	74,51	4	352	1362	0
1188	1188	839	439	69,15	0	173	106	0
1197	986	702	394	54,68	3	80	201	0
1221	1086	685	431	67,71	1	168	232	0
1129	7502	5504	431	68,84	10	1215	737	0
1230	6599	4629	391	55,86	4	705	1261	0
1312	3549	2691	425	67,67	3	335	520	0
1313	6708	4906	420	71,48	1	697	1104	0
1315	5761	4352	435	67,49	7	702	700	0
1316	4836	3761	436	69,48	7	457	611	0
1317	5512	4178	427	67,97	3	593	738	0
1318	4703	3458	433	68,15	3	770	472	0
1320	5386	3970	404	62,37	2	476	938	0
2010	5935	4637	444	68,39	7	544	747	0

Tabla 15: Total de secuencias obtenidas tras el análisis con RDP, número de secuencias tras el corte, longitud media de las mismas y desviación estándar de dicha longitud, y motivos por los cuáles han sido eliminadas las secuencias descartadas del RUN 45.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- RUN 48: saliva no estimulada (2° octavo de placa)

muestra	total secuencias	seqs después del corte	Long media de seq después del corte	Desviación estándar de longitud de seq	Secuencias eliminadas por			
					primer trimmer	N count	> 250 bp	Calidad
5	676	128	378	61,94	29	60	418	41
21	1674	491	367	74,41	18	52	1012	101
241	2907	1054	401	74,69	8	191	1354	300
580	741	201	373	71,81	12	30	428	70
581	1717	322	361	73,07	42	51	1188	114
587	1228	460	378	73,92	3	69	558	138
610	1595	593	350	74,45	34	76	755	137
611	2529	872	412	80,76	20	123	1278	236
1093	198	27	372	59,2	35	8	113	15
1094	1211	232	341	64,55	200	57	661	61
1097	2414	752	396	77,24	78	105	1272	207
1170	804	199	350	55,75	42	39	469	55
1182	908	160	370	75,58	84	37	550	77
1183	880	147	326	51,05	26	60	601	46
1187	2770	886	365	73,5	70	153	1431	230
1189	115	22	343	68,87	18	5	56	14
1190	2360	682	389	78,9	119	72	1339	148
1191	440	184	356	69,17	16	18	194	28
1209	1888	367	361	67,01	332	36	1022	131
1216	936	210	369	64,81	34	75	530	87
1220	678	175	346	68,21	17	19	445	22

Tabla 16: Total de secuencias obtenidas tras el análisis con RDP, número de secuencias tras el corte, longitud media de las mismas y desviación estándar de dicha longitud, y motivos por los cuáles han sido eliminadas las secuencias descartadas del RUN 48 (2° octavo).

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

- RUN 48: saliva no estimulada (3° octavo de placa)

muestra	total secuencias	seqs después del corte	Long media de seq después del corte	Desviación standard de longitud de seq	Secuencias eliminadas por			
					primer trimmer	N count	> 250 bp	Calidad
1	5570	4301	424	69,87	2	553	714	0
6	5358	3627	439	69,32	0	384	1347	0
11	5831	3760	452	64,26	2	383	1686	0
20	4341	2709	450	63,24	0	289	1343	0
189	3172	2063	449	67,35	0	254	855	0
243	5533	3538	456	66,35	4	340	1651	0
315	1885	1102	404	70,13	0	223	560	0
429	2353	1662	423	76,21	0	200	491	0
434	6739	4265	424	72,9	2	648	1824	0
558	1179	876	415	76,07	0	180	123	0
1079	9066	5706	448	67,14	2	684	2674	0
1080	7009	4524	444	68,55	7	485	1993	0
1084	5343	3394	428	72,25	1	525	1423	0
1085	6567	3805	425	70,19	2	649	2111	0
1096	4105	2652	440	67,66	2	314	1137	0
1162	6071	3699	436	70,76	8	471	1893	0
1163	3663	2450	417	73,18	1	531	681	0
1169	5856	3654	440	69,51	4	417	1781	0
1185	5372	3604	438	69,02	7	480	1281	0
1193	4433	2767	444	69,79	3	316	1347	0
1217	5888	3914	443	70,27	3	473	1498	0
1225	39498	25989	446	66,74	21	3348	10140	0
2009	978	739	419	75,4	1	107	131	0
2017	227	156	412	77,45	0	40	31	0

Tabla 17: Total de secuencias obtenidas tras el análisis con RDP, número de secuencias tras el corte, longitud media de las mismas y desviación estándar de dicha longitud, y

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

motivos por los cuáles han sido eliminadas las secuencias descartadas del RUN 45 (3° octavo)

- RUN 53: saliva no estimulada (4° octavo de placa)

muestra	total secuencias	seqs después del corte	Long media de seq después del corte	Desviación standard de long de seq	Secuencias eliminadas por			
					primer trimmer	N count	> 250 bp	Calidad
14	1089	881	490	20,87	0	196	12	0
234	942	782	477	42,78	0	152	8	0
239	754	603	491	12,81	0	139	12	0
430	1579	1216	490	10,23	1	254	108	0
440	2111	1808	486	26,76	2	294	7	0
442	837	675	481	38,84	0	154	8	0
444	914	664	480	27,56	1	244	5	0
447	189	118	485	11,16	0	24	47	0
546	416	324	483	26,64	3	75	14	0
559	1806	1435	483	15,83	0	364	7	0
616	1216	1025	490	16,27	2	175	14	0
620	1063	896	487	18,46	0	161	6	0
1081	1115	869	484	23,58	1	219	26	0
1082	1215	1068	483	23,68	1	135	11	0
1086	347	275	485	8,57	0	67	5	0
1103	885	629	485	22,35	0	234	22	0
1160	1067	764	483	10,22	1	292	10	0
1196	1399	1093	486	23,58	0	299	7	0
1203	2622	1945	482	31,58	4	367	306	0
1231	16	10	488	7,21	0	4	2	0
1314	794	626	487	13,6	1	163	4	0
2015	928	779	460	78,31	0	129	20	0
2019	1124	969	482	34,96	0	144	11	0

Tabla 18: Total de secuencias obtenidas tras el análisis con RDP, número de secuencias tras el corte, longitud media de las mismas y desviación estándar de dicha longitud, y motivos por los cuáles han sido eliminadas las secuencias descartadas del RUN 53.

#### Análisis de datos

Las secuencias se separaron en base a los códigos de barras para determinar la muestra a la que pertenecían, mediante un script en PERL de elaboración propia. Se eliminaron del análisis las secuencias menores de 250 pb y aquellas que no cumplían los mínimos de calidad con parámetros standard del software Newbler (Roche). Las secuencias se compararon mediante el clasificador de la Ribosomal Database Project (RDP) (DeSantis. 2006), bajando hasta el nivel de familia, donde en simulaciones previas, estableció que con una longitud de 400 pb, la fiabilidad en la adscripción taxonómica es superior al 95%, y de género, donde la fiabilidad es superior al 90%. Si la asignación a un determinado nivel taxonómico era igualmente significativa a más de un grupo bacteriano, la asignación se realizaría al nivel taxonómico inmediatamente superior, siguiendo Sogin y cols, 2006 (Cole, 2009).

La clasificación se ha hecho en base a la base de datos de la Ribosomal Database Project, con un intervalo de confianza del 80% (que clasifica correctamente prácticamente el 100% a nivel de clase, que son los resultados obtenidos, y más del 90% a nivel de género) (Cole, 2009).

Tras la obtención de datos, se eliminaron las clases bacterianas correspondientes a bacterias fotosintéticas como cianobacterias, cloroplastos, que son amplificadas por los primers universales y son artefactos.

Posteriormente, se agruparon los datos obtenidos por clase y genero taxonómico para la creación de tablas mediante el programa Microsoft Excel 2000. Se realizaron graficas por clase y por género de muestra de cada subgrupo, los resultados de las cuales se unificaron para crear tablas comparativas.

Las curvas de rarefacción se realizarán, a nivel de género, con la aplicación de la RDP, calculando además mediante el índice Chao1 el número total de géneros presentes; a nivel de especie, se agruparán las secuencias al 97% de identidad mediante el programa CD-HIT, haciendo las curvas de rarefacción con MOTUR. La comparación de las muestras entre sí se llevará a cabo mediante análisis de correspondencia mediante los programas QIIME y UNIFRAC, desarrollados por el consorcio del Microbioma

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

Humano específicamente para análisis y comparación de pirosecuencias del 16S con una aproximación filogenética (Lozupone et al. 2006). Cuando el número de secuencias supere el máximo de esta aplicación, se pedirá el permiso correspondiente y/o se llevará a cabo el mismo tipo de análisis mediante el paquete estadístico R. Las comparaciones contra la base de datos del NCBI se realizarán mediante BLAST locales en nuestro servidor de cálculo de 4 hexacores, donde se actualiza regularmente la base de datos nr.



## **4. RESULTADOS**



**4.1.- ESTUDIO EN MUESTRAS DE SALIVA NO ESTIMULADA.**

En este grupo experimental se incluyeron 110 muestras de saliva no estimulada procedentes de niños explorados en el Estudio Epidemiológico de Salud Oral de la Comunidad Valenciana (EECV\_2010).

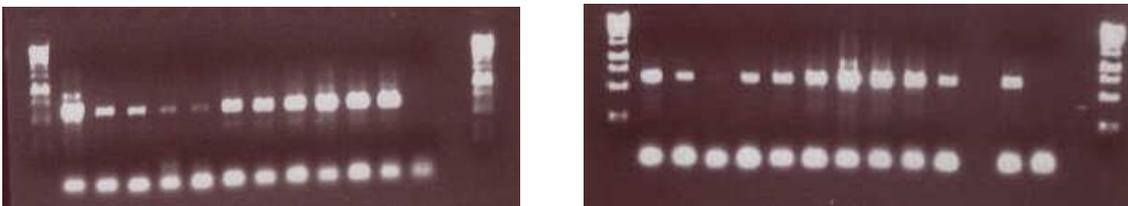
Subgrupo	Nº muestras estudiadas
0 puro	20
0+obts	20
1 puro	19
Mxbl+obts	18
Cav+obts	17
Cav sin obts	16

Tabla 19: Distribución subgrupos estudiados y número de muestras por subgrupo.

*4.1.1- RESULTADOS OBTENIDOS TRAS ESTUDIO DE PCR Y GEL DE AGAROSA AL 1%.*

**1.- Grupo 1. Código ICDAS 00 (Libres de caries, sin antecedentes de la enfermedad): cero puro (0 puro).**

Incluye el estudio mediante PCR del gen del rRNA del 16S mediante PCR y posterior comprobación con gel de Agarosa al 1% visualizado con luz ultravioleta de 20 muestras de saliva no estimulada de niños de 12 años de edad sin lesiones de caries ni antecedentes de la enfermedad.



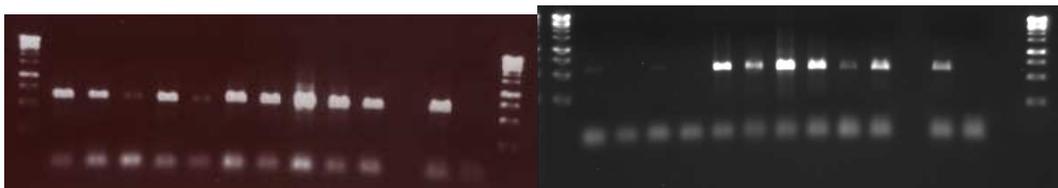
Figuras 2 y 3: Gel de agarosa obtenido tras la PCR de las muestras del grupo 1.

	<b>Id. EECV_2010</b>	<b>ADN (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>1/8 PLACA PARA PIROSECUENCIAR</b>	<b>PRIMER PIROSECUENCIADOR</b>
1	1316	235.8	1	22
2	1221	194.4	1	18
3	544	154.3	est-no est	4
4	1088	143.1	1	14
5	552	137.2	est-no est	7
6	1318	128.2	1	23
7	1230	117.4	1	20
8	1098	115.4	1	15
9	540	103.8	est-no est	3
10	548	95.9	est-no est	5
11	1173	89.7	1	16
12	612	84.3	est-no est	11
13	1320	82.8	1	24
14	1315	82.1	1	21
15	613	79.8	est-no est	12
16	1188	79.5	1	17
17	557	77.1	est-no est	10
18	2010	73.6	1	25
19	618	73.2	est-no est	13
20	1229	72.7	1	19

Tabla 20: Relación de pacientes, nanogramos de ADN por microlitro según el nanodrop, octavo de placa asignado en el pirosecuenciador y primer utilizado para la secuenciación del 16S.

**2.- Grupo 2. Código ICDAS X 0 (Libres de caries actuales, con antecedentes de la enfermedad): cero con antecedentes (0+obts).**

Incluye el estudio mediante PCR del gen del rRNA del 16S mediante PCR y posterior comprobación con gel de Agarosa al 1% visualizado con luz ultravioleta de 20 muestras de saliva no estimulada de niños de 12 años de edad sin lesiones de caries con antecedentes de la enfermedad.



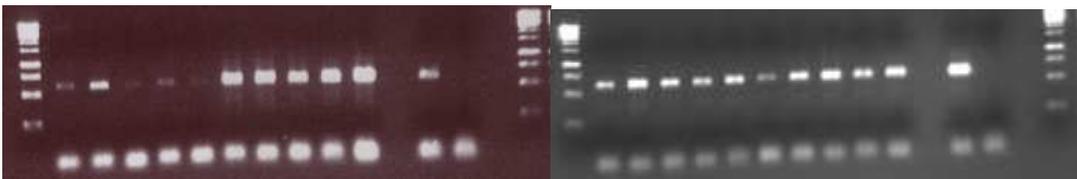
Figuras 4 y 5: Gel de agarosa obtenido tras la PCR de las muestras del grupo 2.

	<b>Id EECV_2010</b>	<b>ADN (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>1/8 PLACA PARA PIROSECUENCIAR</b>	<b>PRIMER PIROSECUENCIADOR</b>
1	1313	307.7	1	5
2	1317	230.1	1	7
3	1312	227.5	1	4
4	317	222.1	1	11
5	1178	158.7	1	33
6	1162	157	3	32
7	554	141.7	1	10
8	1197	140.9	1	39
9	1226	139.5	2	40
10	578	110.8	est-no est	26
11	1189	110.5	2	35
12	587	98.9	2	30
13	1187	95.7	2	34
14	1097	90.7	2	31
15	1216	85.3	2	3
16	580	63.4	2	28
17	581	54.5	2	29
18	1191	54.3	2	38
19	579	52.6	est-no est	27
20	1190	40.2	2	37

Tabla 21: Relación de pacientes, nanogramos de ADN por microlitro según el nanodrop, octavo de placa asignado en el pirosecuenciador y primer utilizado para la secuenciación del 16S.

**3.- Grupo 3. Código ICDAS 01 (Paciente con lesiones iniciales de caries sin antecedentes):** Lesiones iniciales de caries (código 1 y 2 de ICDAS) sin antecedentes de caries, sin obturaciones (**1 puro**).

Incluye el estudio mediante PCR del gen del rRNA del 16S mediante PCR y posterior comprobación con gel de Agarosa al 1% visualizado con luz ultravioleta de 19 muestras de saliva no estimulada de niños de 12 años de edad con lesiones de caries ni antecedentes de la enfermedad.



Figuras 6 y 7: Gel de agarosa obtenido tras la PCR de las muestras del grupo 3.

	<b>Id EECV_2010</b>	<b>ADN (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>1/8 PLACA PARA PIROSECUENCIAR</b>	<b>PRIMER PIROSECUENCIADOR</b>
1	20	292.5	3	31
2	13	205.9	2	30
3	1225	178.5	3	29
4	1170	164.2	2	22
5	11	154.6	3	28
6	1182	137.4	2	18
7	5	133.6	2	25
8	1093	131.7	2	16
9	21	130.2	2	24
10	1094	125.5	2	17
11	435	122.3	2	13
12	241	121.1	2	26
13	1220	120.5	2	27
14	1169	120.4	3	21
15	1185	113.4	3	19
16	1163	113.2	3	20
17	429	107.8	3	12
18	189	98.7	3	23
19	1079	97.5	3	15

Tabla 22: Relación de pacientes, nanogramos de ADN por microlitro según el nanodrop, octavo de placa asignado en el pirosecuenciador y primer utilizado para la secuenciación del 16S.

#### **4.- Grupo 4. Código ICDAS X 1 ó 2: Lesiones iniciales de caries (código 1 y 2 de ICDAS) con antecedentes de caries, con obturaciones (Mxbl+obts).**

Incluye el estudio mediante PCR del gen del rRNA del 16S mediante PCR y posterior comprobación con gel de Agarosa al 1% visualizado con luz ultravioleta de 18 muestras de saliva no estimulada de niños de 12 años de edad con lesiones de caries y antecedentes de la enfermedad.



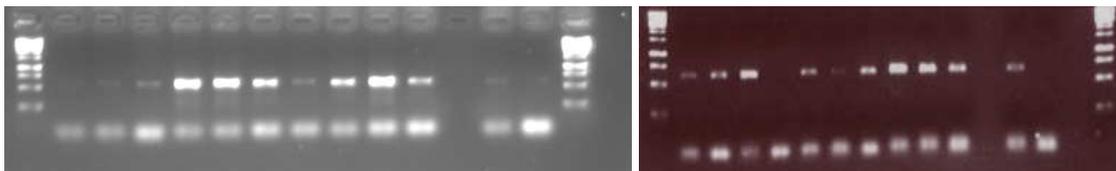
Figuras 8 y 9: Gel de agarosa obtenido tras la PCR de las muestras del grupo 4.

	<b>Id EECV_2010</b>	<b>ADN (ng/μL)</b>	<b>1/8 PLACA PARA PIROSECUENCIAR</b>	<b>PRIMER PIROSECUENCIADOR</b>
1	1231	155	4	15
2	1096	131.7	3	30
3	1085	124.2	3	37
4	1203	58.1	4	19
5	243	118	3	6
6	1084	112.8	3	35
7	1193	108.5	3	40
8	611	54.7	2	11
9	2007	103	2	24
10	244	101.4		17
11	1217	100.7	3	4
12	6	98.1	3	13
13	239	46.4	4	16
14	1086	91.8	4	38
15	1081	77.4	4	33
16	1082	73.5	4	34
17	1196	69.2	4	5
18	440	59.6	4	32

Tabla 23: Relación de pacientes, nanogramos de ADN por microlitro según el nanodrop, octavo de placa asignado en el pirosecuenciador y primer utilizado para la secuenciación del 16S.

**5.- Grupo 5. Código ICDAS XY (Paciente con lesiones de caries con pérdida de continuidad con antecedentes).** Lesiones cavitadas (códigos 3 a 6 de ICDAS) con antecedentes de caries, con obturaciones (**Cav+obts**).

Incluye el estudio mediante PCR del gen del rRNA del 16S mediante PCR y posterior comprobación con gel de Agarosa al 1% visualizado con luz ultravioleta de 17 muestras de saliva no estimulada de niños de 12 años de edad con lesiones de caries y antecedentes de la enfermedad.



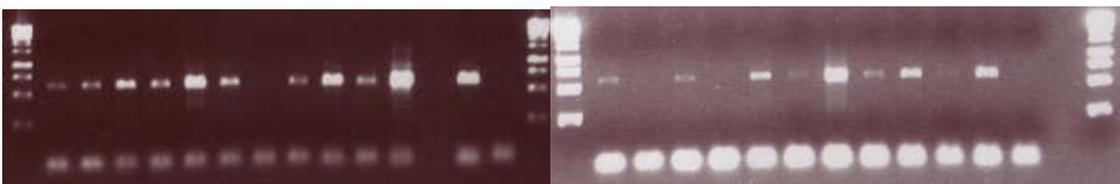
Figuras 10 y 11: Gel de agarosa obtenido tras la PCR de las muestras del grupo 5.

	<b>Id EECV_2010</b>	<b>ADN (ng/μL)</b>	<b>1/8 PLACA PARA PIROSECUENCIAR</b>	<b>PRIMER PIROSECUENCIADOR</b>
1	1209	336.4	2	33
2	620	295.1	4	23
3	1103	231.4	4	27
4	444	221.8	4	22
5	1160	145.3	4	31
6	234	130.2	4	24
7	559	128.6	4	37
8	1184	125.1	1	38
9	1183	120.3	2	32
10	442	117.1	4	20
11	1314	112.4	4	39
12	546	111.1	4	35
13	1106	108	1	30
14	542	105.2	1	34
15	432	93.9	1	29
16	1095	80.3	1	26
17	2019	47.9	4	40

Tabla 24: Relación de pacientes, nanogramos de ADN por microlitro según el nanodrop, octavo de placa asignado en el pirosecuenciador y primer utilizado para la secuenciación del 16S.

**6.- Grupo 6. Código ICDAS 0Y (Paciente con lesiones de caries con pérdida de continuidad sin antecedentes):** Lesiones cavitadas (códigos 3 a 6 de ICDAS) sin antecedentes de caries, sin obturaciones (**Cav sin obts**).

Incluye el estudio mediante PCR del gen del rRNA del 16S mediante PCR y posterior comprobación con gel de Agarosa al 1% visualizado con luz ultravioleta de 16 muestras de saliva no estimulada de niños de 12 años de edad con lesiones de caries sin antecedentes de la enfermedad.



Figuras 12 y 13: Gel de agarosa obtenido tras la PCR de las muestras del grupo 6.

#### 4. RESULTADOS

	<b>Id EECV_2010</b>	<b>ADN (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>1/8 PLACA PARA PIROSECUENCIAR</b>	<b>PRIMER PIROSECUENCIADOR</b>
1	315	412.5	3	14
2	616	339.9	4	13
3	610	325	2	12
4	430	301.5	4	4
5	2017	298.5	3	18
6	558	289.1	3	25
7	2021	262.3	2	19
8	2015	215.6	4	17
9	1080	210.5	3	11
10	2006	189.1	2	15
11	1	183.3	3	22
12	14	182.4	4	3
13	2009	177.4	3	16
14	447	174	4	10
15	441	159.9	4	21
16	434	149.9	3	5

Tabla 25: Relación de pacientes, nanogramos de ADN por microlitro según el nanodrop, octavo de placa asignado en el pirosecuenciador y primer utilizado para la secuenciación del 16S.

#### 4.1.2- RESULTADOS OBTENIDOS TRAS ANALISIS Y PIROSECUENCIACION.

Tras el estudio mediante la base de datos Ribosomal Database Project (RDP), se obtuvieron las secuencias de cada una de las muestras estudiadas, las cuáles fueron clasificadas a nivel de clase y género. En cada uno de estas categorías, se almacenaron los resultados en formato Excel, para su posterior distribución en gráficas porcentuales, las cuáles son recogidas a continuación:

##### 1.- Grupo 1. Código ICDAS 00 (Libres de caries, sin antecedentes de la enfermedad): cero puro (0 puro).

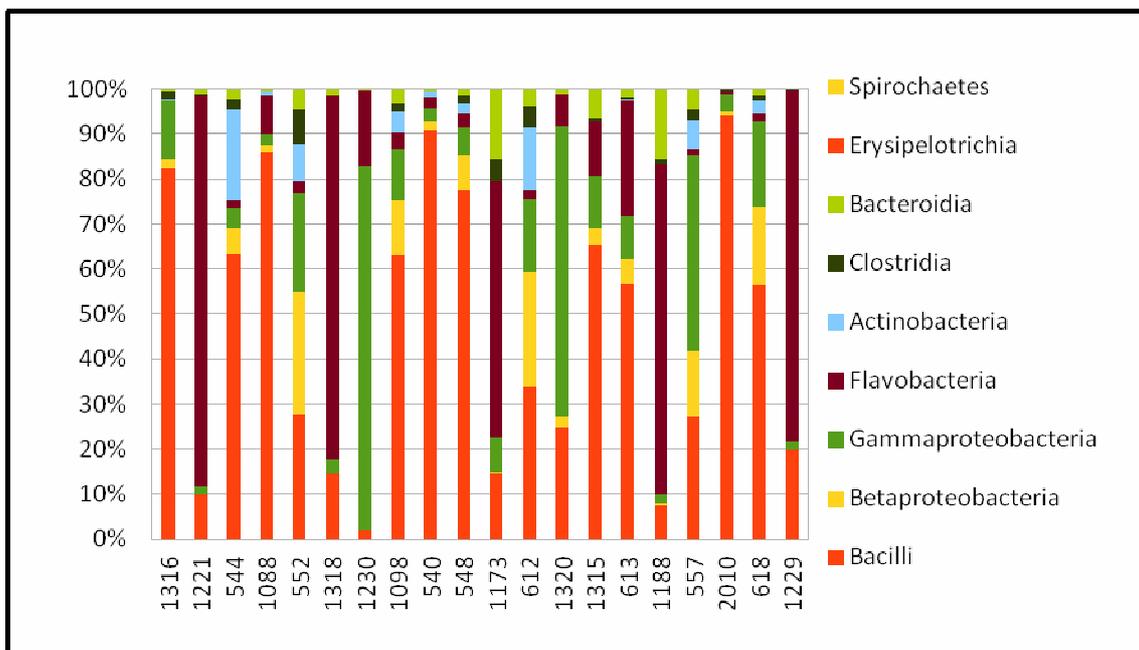


Figura 14: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes sanos sin antecedentes de la enfermedad (0 puro).

## 4. RESULTADOS

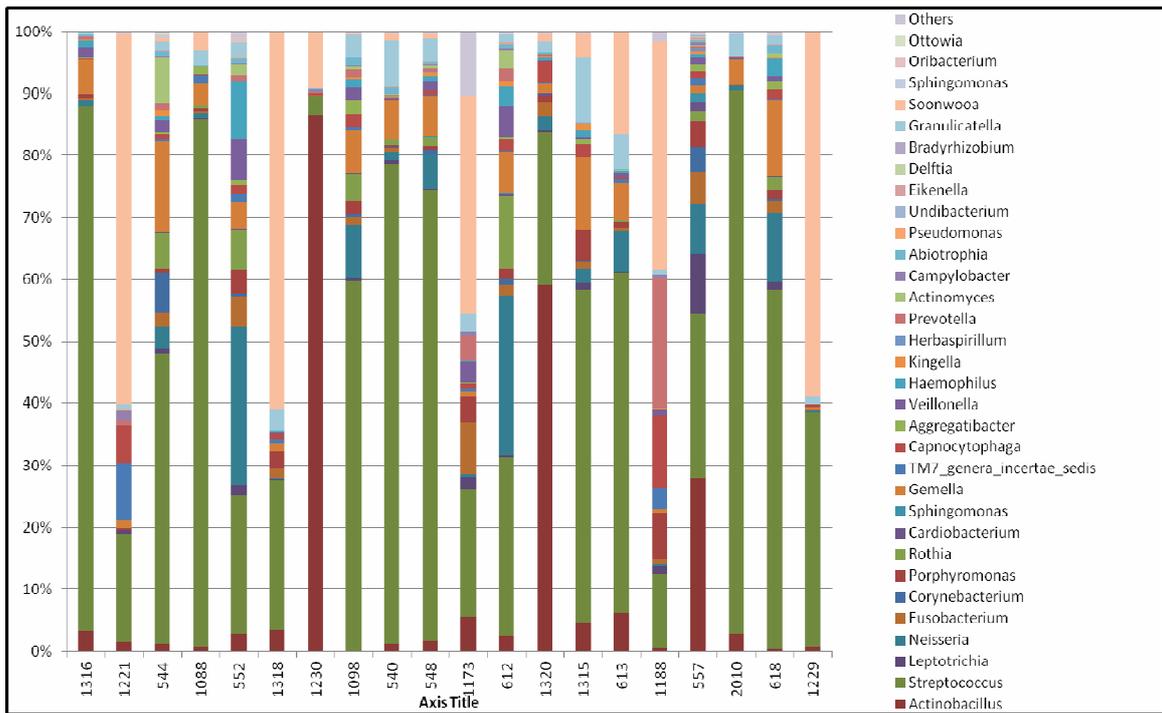


Figura 15: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva no estimulada de pacientes sanos sin antecedentes de la enfermedad (**0 puro**).

**2.- Grupo 2. Código ICDAS X 0 (Libres de caries actuales, con antecedentes de la enfermedad): cero con antecedentes (0+obts).**

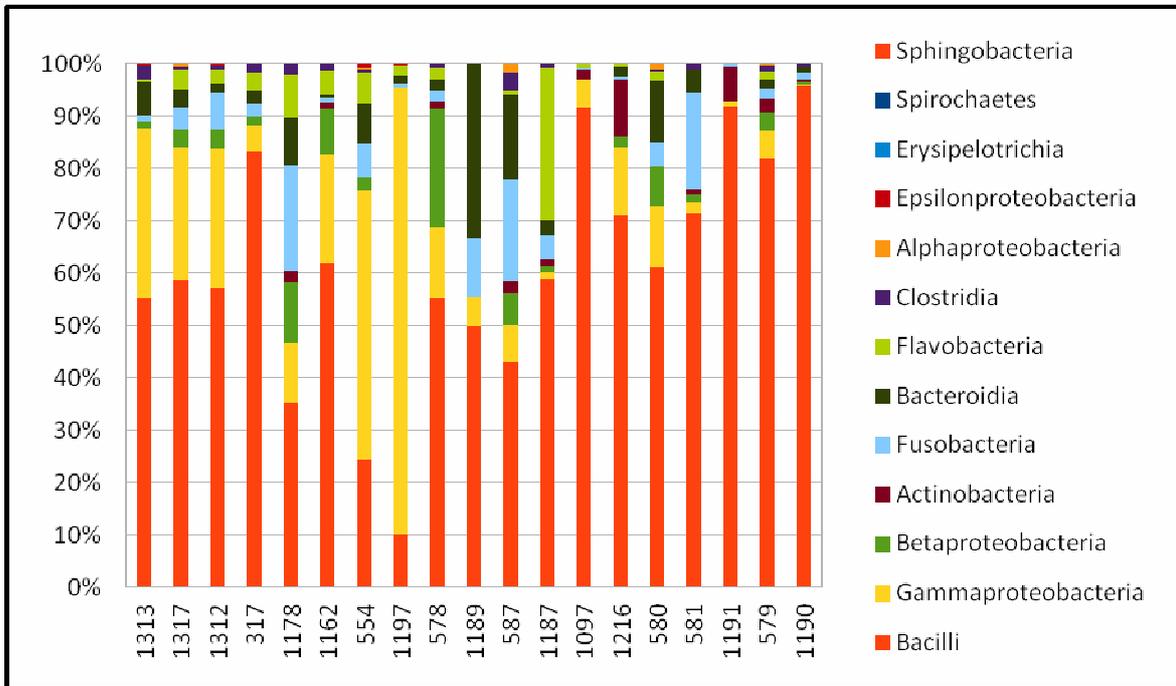


Figura 16: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes sanos con antecedentes de la enfermedad (0+obts).

## 4. RESULTADOS

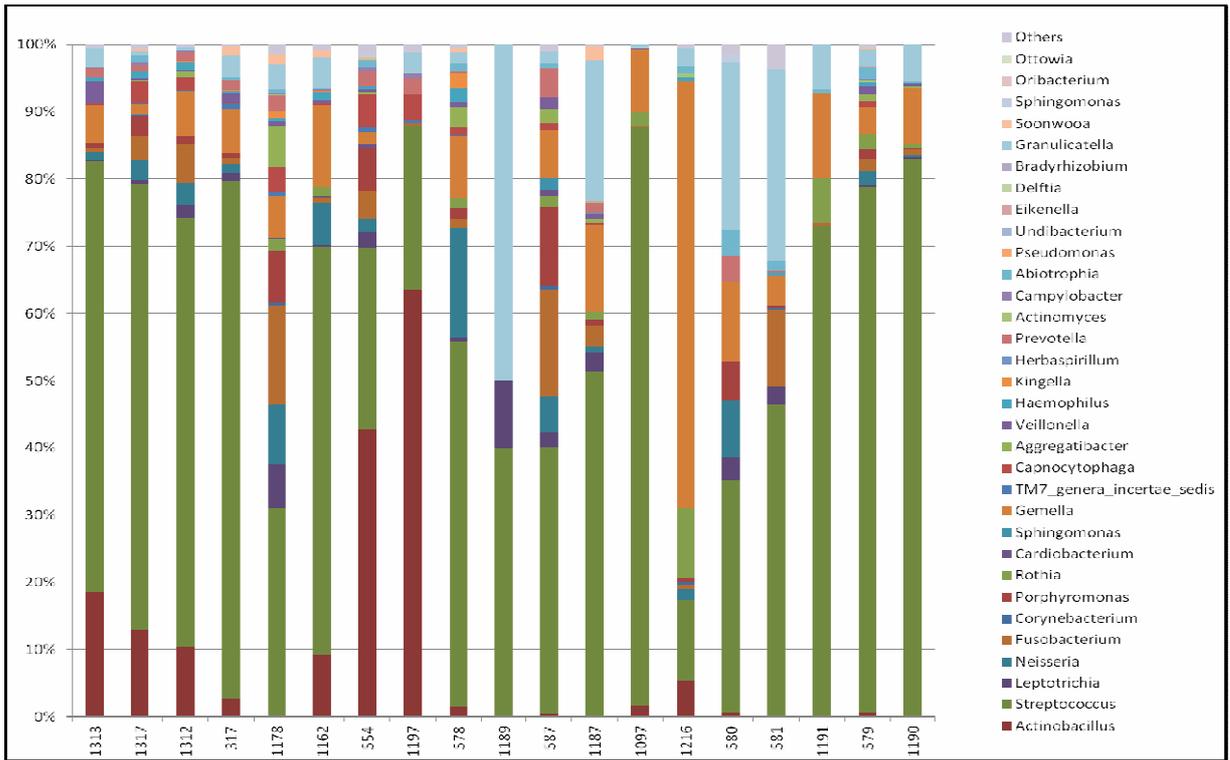


Figura 17: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes sanos con antecedentes de la enfermedad (**0+obts**).

**3.- Grupo 3. Código ICDAS 01 (Paciente con lesiones iniciales de caries sin antecedentes):** Lesiones iniciales de caries (código 1 y 2 de ICDAS) sin antecedentes de caries, sin obturaciones (**1 puro**).

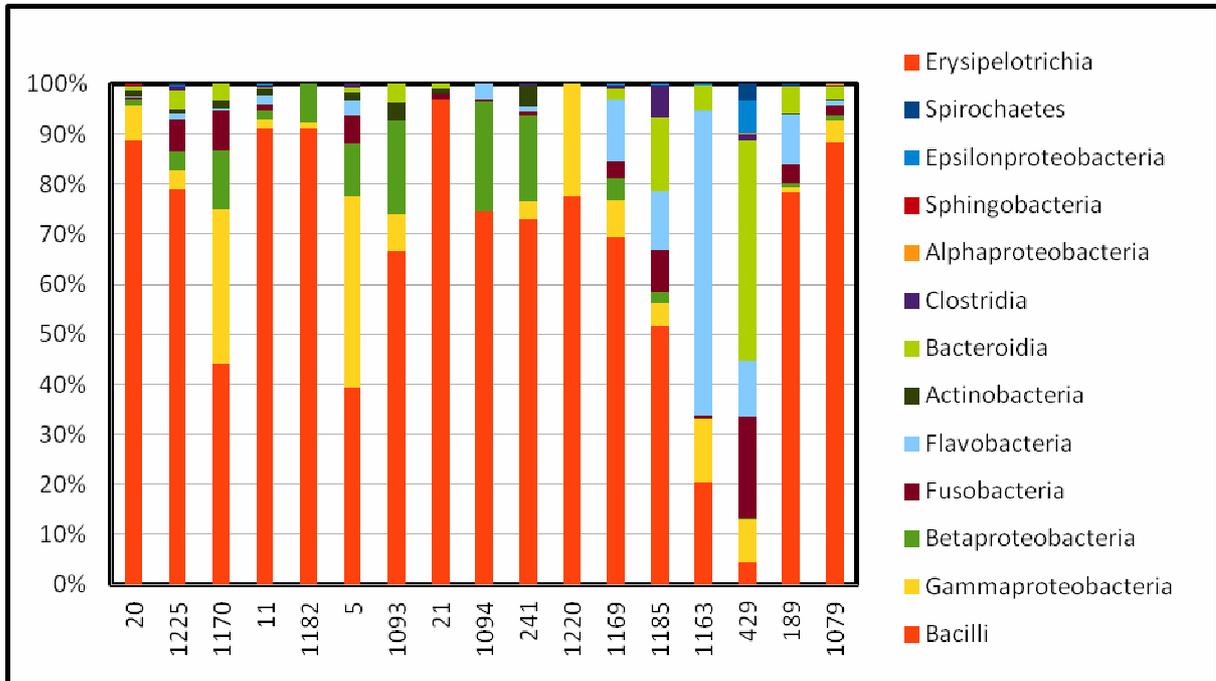


Figura 18: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad y sin antecedentes (**1 puro**).

## 4. RESULTADOS

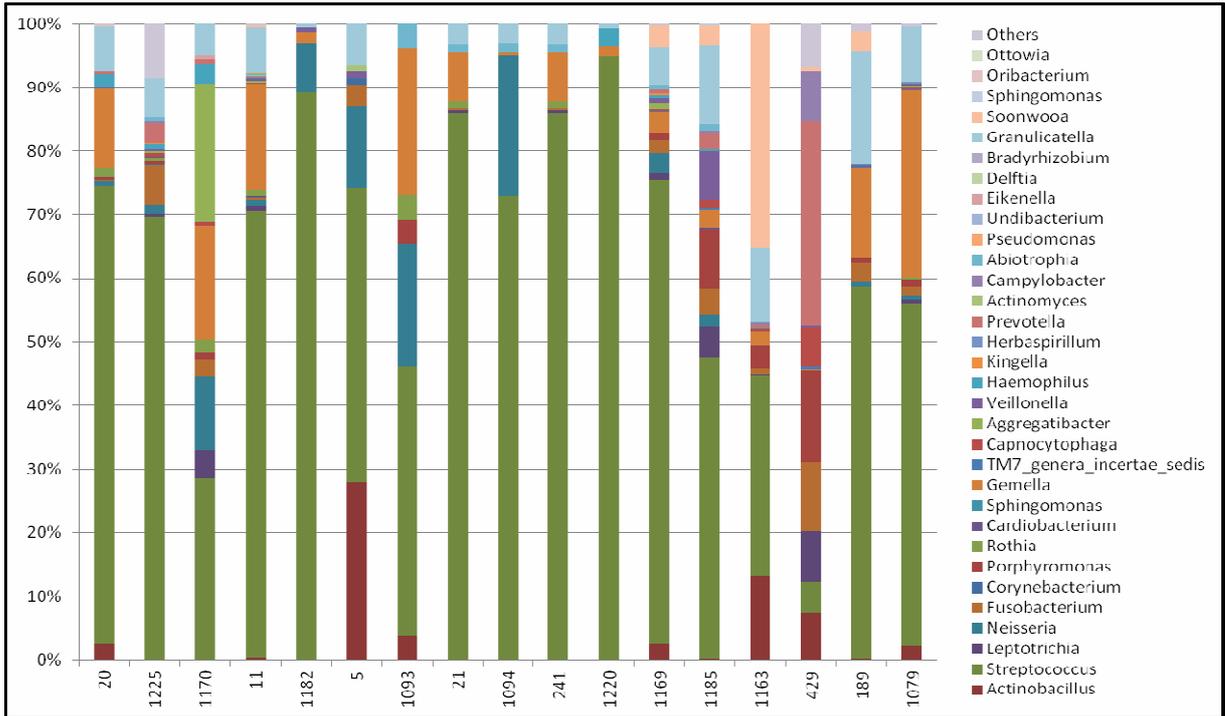


Figura 19: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad y sin antecedentes (**1 puro**).

**4.- Grupo 4. Código ICDAS X 1 ó 2: Lesiones iniciales de caries (código 1 y 2 de ICDAS) con antecedentes de caries, con obturaciones (Mxbl+obts).**



Figura 20: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad con antecedentes (Mxbl+obts).

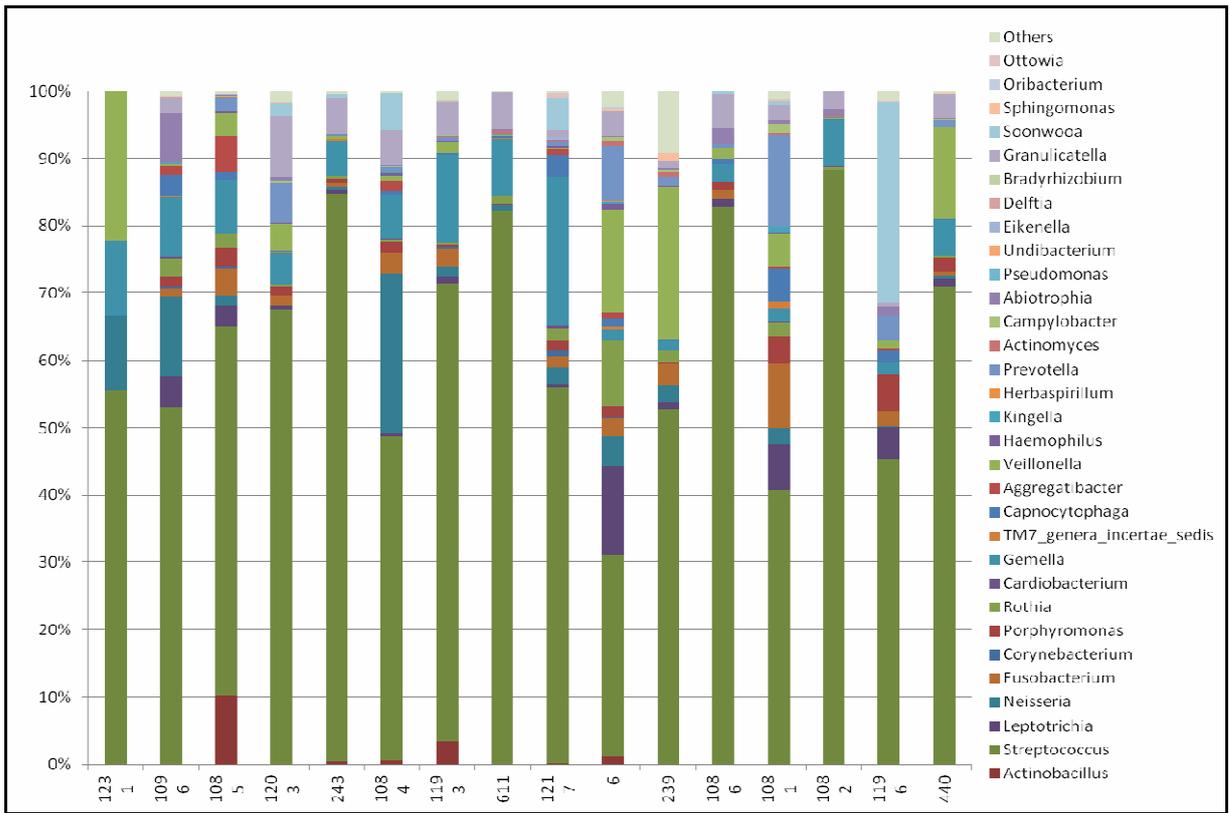


Figura 21: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad con antecedentes (Mxbl+obts).

**5.- Grupo 5. Código ICDAS XY (Paciente con lesiones de caries con pérdida de continuidad con antecedentes).** Lesiones cavitadas (códigos 3 a 6 de ICDAS) con antecedentes de caries, con obturaciones (**Cav+obts**).

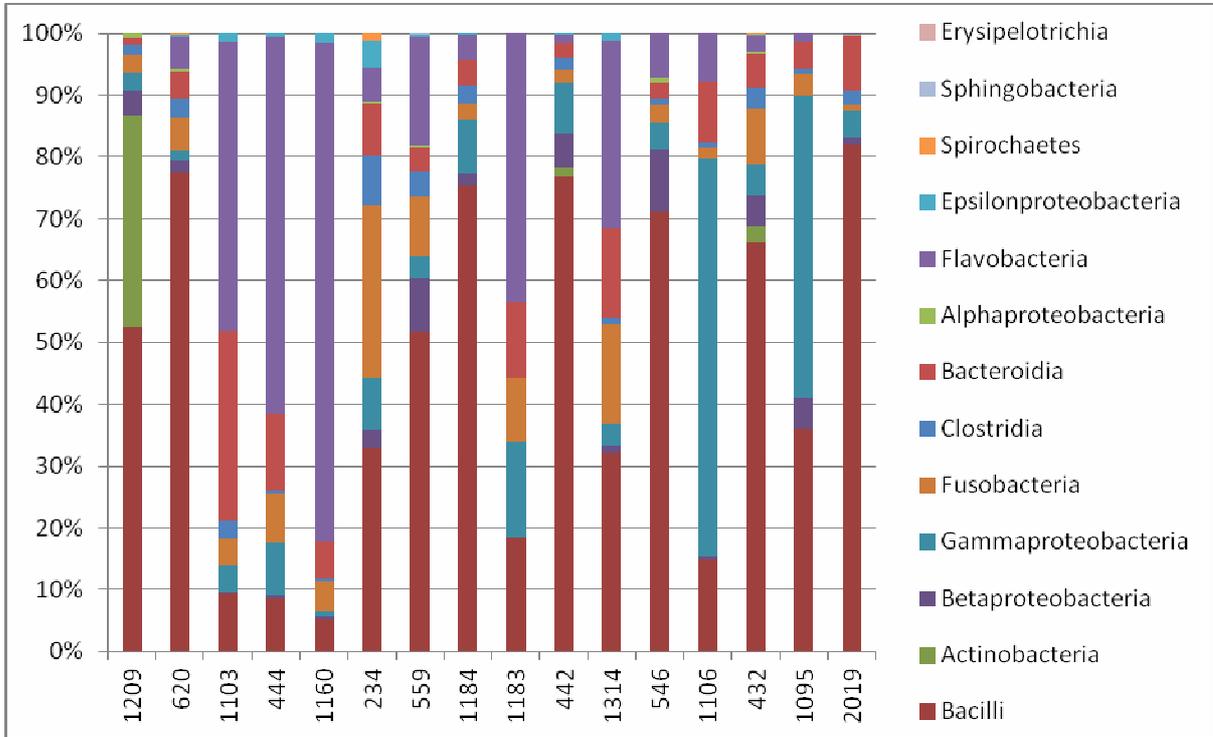


Figura 22: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones cavitadas con antecedentes (**Cav+obts**).

#### 4. RESULTADOS

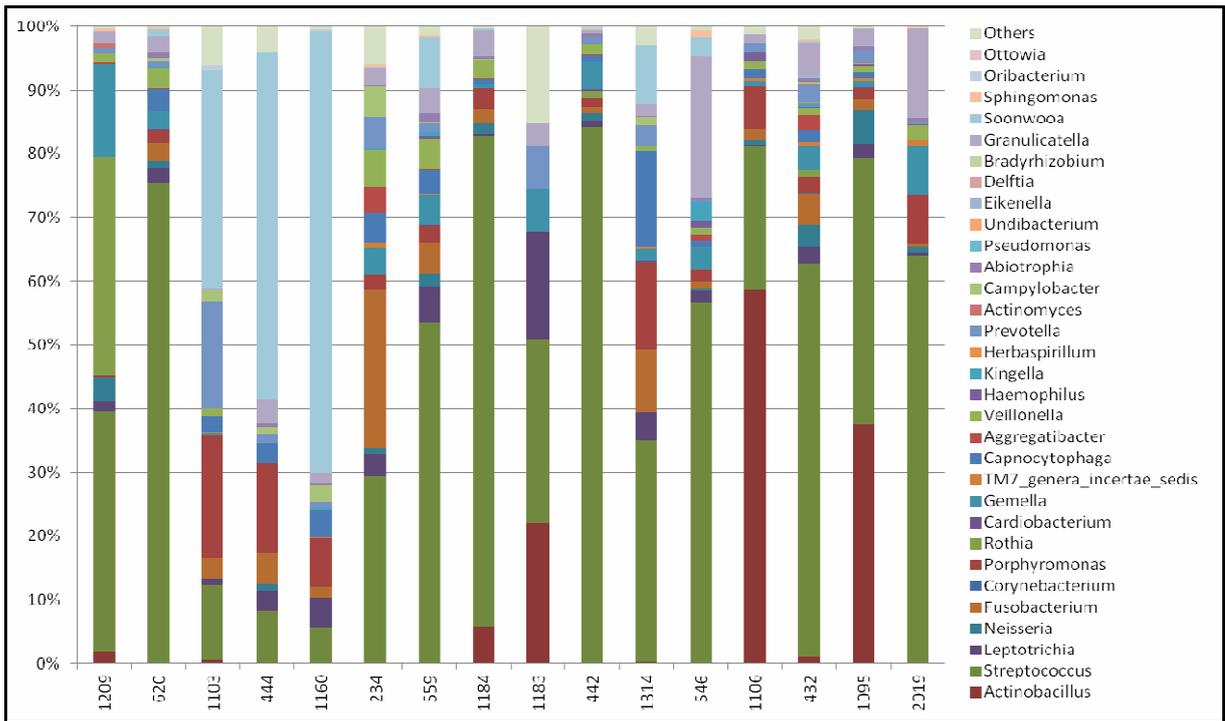


Figura 23: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones cavitadas con antecedentes (**Cav+obts**).

**6.- Grupo 6. Código ICDAS 0Y (Paciente con lesiones de caries con pérdida de continuidad sin antecedentes):** Lesiones cavitadas (códigos 3 a 6 de ICDAS) sin antecedentes de caries, sin obturaciones (**Cav sin obts**).

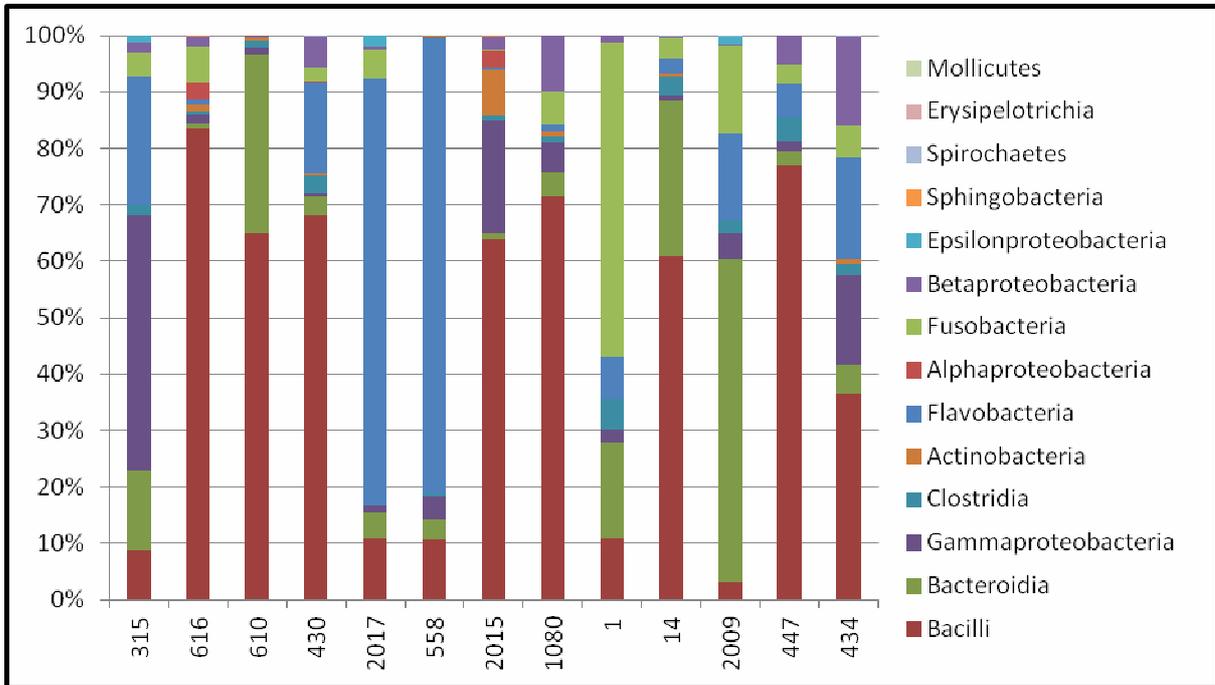


Figura 24: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes (**Cav sin obts**).

## 4. RESULTADOS

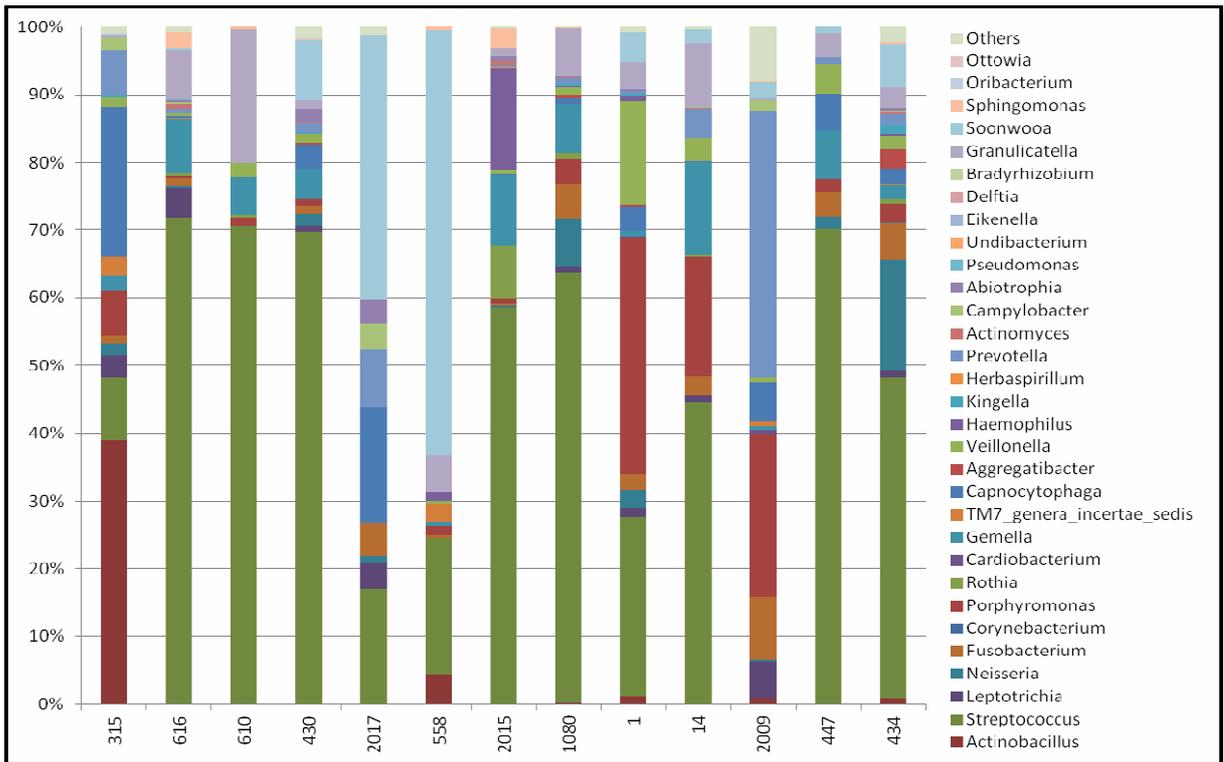


Figura 25: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva no estimulada de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes (**Cav sin obts**).

## 7.- Comparativa subgrupos a nivel de clase y de género taxonómico.

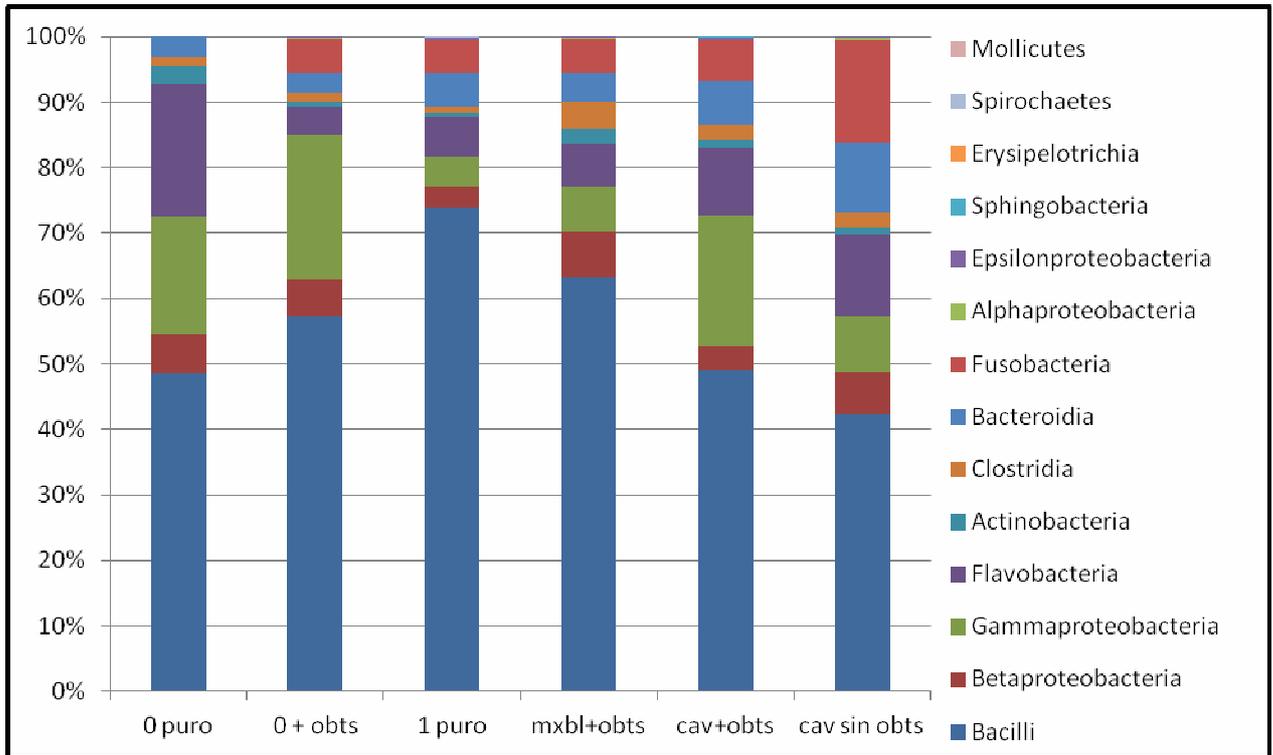


Figura 26: Comparativa entre subgrupos a nivel de clase taxonómica.

La clase taxonómica Bacilli es el más abundante en todos los grupos estudiados, desde un 42'2% en el subgrupo de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes a un 73'8 %, en las muestras de saliva no estimulada de los pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad con antecedentes.

*Betaproteobacteria* oscila entre un 3'1% y 6'5%, correspondiendo a las muestras de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad con antecedentes y a las del subgrupo de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes.

*Gammaproteobacteria* es más abundante en las muestras de pacientes sanos con antecedentes de la enfermedad con un 22'14%, mientras que la menos proporción de esta clase se da en las muestras del subgrupo de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad sin antecedentes con un 4'82%.

*Flavobacteria* aparece en mayor proporción en las muestras de pacientes sanos sin antecedentes de la enfermedad con un 20'3% mientras que su presencia es la menos representativa en el subgrupo de pacientes sanos con antecedentes de la enfermedad con un 4'19%.

Los niveles de *Actinobacteria* oscilan entre el 2'77% y 0'70%, en las muestras del subgrupo de pacientes sanos sin antecedentes de la enfermedad y las correspondientes a aquellos con lesiones iniciales de caries sin antecedentes, respectivamente.

La clase *Clostridia* es más abundante en el grupo de pacientes con lesiones iniciales con antecedentes de la enfermedad con un 4'23%, mientras que el valor más bajo, 0'95%, se observa en los pacientes con lesiones iniciales sin antecedentes.

Las muestras pertenecientes al subgrupo de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes de la enfermedad presentan la mayor proporción de *Bacteroidia* con un 10'71%, en cambio, el subgrupo de sanos con antecedentes de la enfermedad presenta el valor más inferior, siendo este de 2'96%.

Los niveles más elevados de *Fusobacteria* se observan en los pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes con un 15'59% del total, mientras que los más bajos se dan en los pacientes sanos sin antecedentes en los cuales no se detectó dicha clase bacteriana.

Las clases bacterianas *Alphaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Sphingobacteria*, *Erysipelotrichia*, *Spirochaetes* y *Mollicutes* aparecen en proporciones inferiores al 1%, destacando su ausencia en el subgrupo de pacientes sanos sin antecedentes de la enfermedad y mayor abundancia en el subgrupo de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes de la enfermedad.

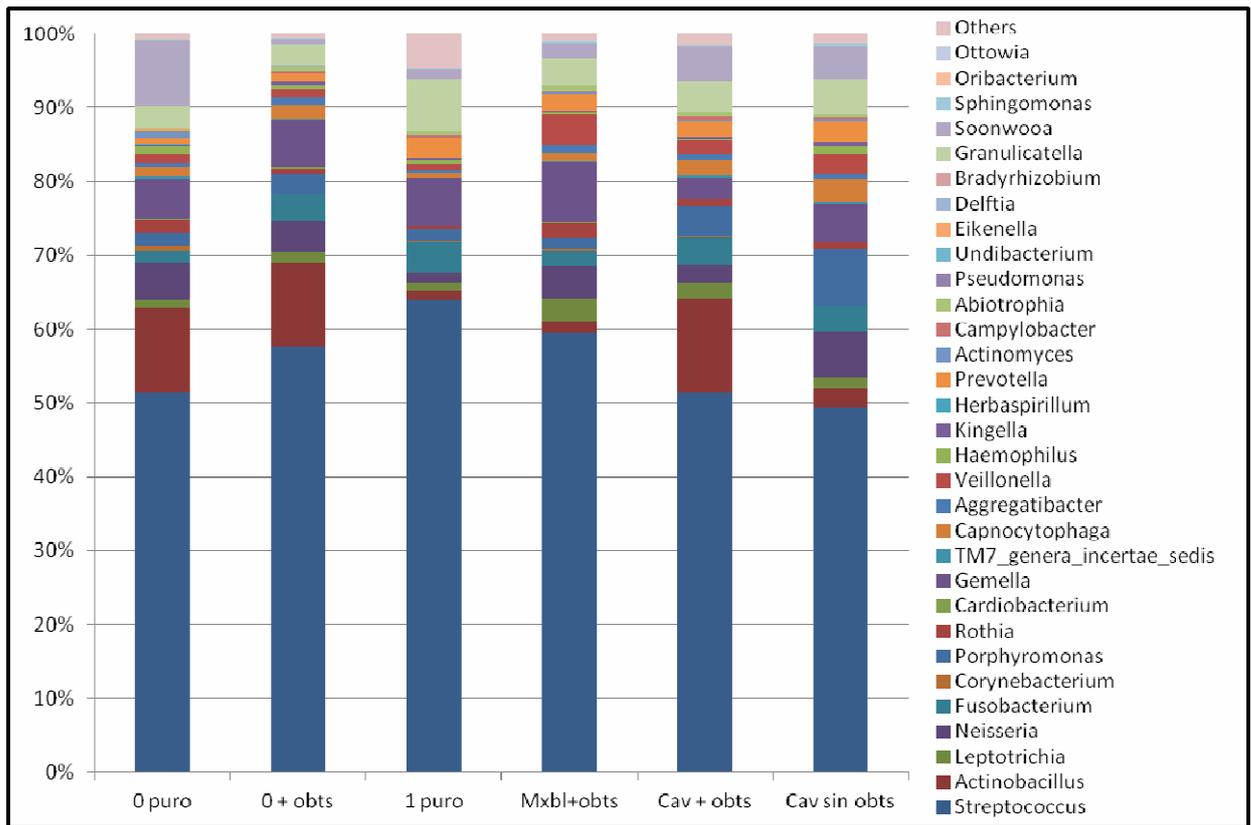


Figura 27: Comparativa entre subgrupos a nivel de género taxonómico.

El género *Streptococcus* es el más abundante en todos los subgrupos, dominando en las muestras de pacientes con lesiones iniciales sin antecedentes de la enfermedad con un 63'93% del total, y con menor proporción, pero casi siendo el 50% total (49'40%) en el subgrupo de pacientes con lesiones cavitadas sin antecedentes de la enfermedad. Esto sugiere una predominancia de dicho género en la saliva no estimulada de todos los pacientes, determinando que este tipo de muestra es un medio habitual de presencia de *Streptococcus*. En los subgrupos con lesiones iniciales de la enfermedad aparece con mayor abundancia, lo que sugiere que un aumento de los niveles de *Streptococcus* en saliva no estimulada podría ser un indicador de riesgo de sufrir lesiones iniciales de caries.

El género *Actinobacillus* se observa con mayor predominio siendo el segundo en cuanto a proporción en los subgrupos de pacientes sanos sin antecedentes, sanos con antecedentes y con lesiones cavitadas con antecedentes (11'40%, 11'26% y 12'53%). En cambio, en los subgrupos de pacientes con lesiones iniciales sin antecedentes, lesiones iniciales con antecedentes y lesiones cavitadas sin antecedentes, los valores son

menores (1'22%, 1'71% y 2'66%, respectivamente). Este género bacteriano parece disminuir cuando los pacientes se encuentran en las primeras fases de la enfermedad, con lo que su descenso en el total bacteriano de la saliva estimulada puede indicar una situación de riesgo de lesiones iniciales.

El género *Porphyromonas* aparece con mayor abundancia en los subgrupos con lesiones cavitadas, tanto con antecedentes como sin antecedentes (4'03% y 7'77%, respectivamente), lo que sugiere que la presencia de lesiones abiertas de caries favorece un aumento de los niveles de *Porphyromonas* en saliva no estimulada. En los subgrupos de pacientes con lesiones iniciales de caries, sin y con antecedentes, los valores son inferiores (1'63% y 1'54%, respectivamente), así como en los pacientes sanos sin y con antecedentes (1'64% y 2'58%, respectivamente), en los cuales no existen cavidades de caries.

El género *Gemella* oscila en proporciones entre 7'98% en el subgrupo de pacientes con lesiones iniciales con antecedentes de la enfermedad y 2'74% en aquellos con lesiones cavitadas con antecedentes de la enfermedad, lo que sugiere que la saliva no estimulada es un medio habitual de colonización por parte de este género bacteriano sin variabilidad en función del estado de salud cariogénico.

El género TM7\_genera\_incertae\_sedis se observa en proporciones muy bajas, entre 0'09% y 0'43%, pero presente en todos los subgrupos estudiados, pese a su origen periodontal, aparece representado en saliva no estimulada.

En los subgrupos de pacientes con lesiones cavitadas con antecedentes, el género *Capnocytophaga* es el 2'11% y 3'06%, valores ligeramente superiores a los observados en los otros subgrupos (1'19%, 1'77%, 0'61% y 1'17%), sugiriendo una posible relación entre la presencia de lesiones cavitadas y el aumento de los niveles de *Capnocytophaga* en saliva no estimulada.

Los subgrupos con antecedentes de la enfermedad presentan niveles superiores del género *Aggregatibacter* (1'1%, 1'07% y 0'81%), que los observados en los subgrupos sin antecedentes (0'56%, 0'37%, 0'71%).

Los pacientes sanos sin y con antecedentes presentan unos niveles de *Prevotella* en saliva no estimulada de 0'84% y 1'17%, mientras que en subgrupos de lesiones iniciales y con lesiones cavitadas, tanto sin como con antecedentes de la enfermedad, se observa una mayor proporción de este género bacteriano, oscilando entre 2'20% y 3'03%. Este resultado sugiere un posible aumento del género *Prevotella* en saliva no estimulada en aquellos pacientes que presentan la enfermedad tanto en sus estadios iniciales como cavitados.

La misma situación se produce en el género *Granullicatella* en el que los pacientes sanos sin y con antecedentes de la enfermedad presentan unos niveles inferiores en saliva no estimulada (2'93% y 2'97%) respecto a los pacientes con lesiones iniciales y cavitadas tanto sin como con antecedentes, donde las proporciones de *Granullicatella* oscilan entre 3'49% y 7'12%. Esto puede sugerir una posible relación entre el aumento del género *Granullicatella* en saliva no estimulada y la presencia de lesiones de caries, tanto iniciales como cavitadas.

El género *Soovooa* aparece en su mayor nivel en el grupo de pacientes sano sin antecedentes de la enfermedad (8'82%). Por otro lado, en los pacientes con lesiones iniciales y cavitadas, sin y con antecedentes, los valores son inferiores (1'39%, 2'26%, 4'81% y 4'39%, respectivamente). Podrían relacionarse niveles bajos de este género en saliva no estimulada cuando existe presencia de lesiones de caries iniciales o cavitadas.

#### 4.1.3- .CURVAS DE RAREFRACCIÓN.

<b>Grupo</b>	<b>Secuencias</b>
Saliva Estimulada	18023
Saliva no estimulada	19893
0 puro	59877
0+obts	39306
1 puro	54031
Mxbl+obts	28796
Cav+obts	23660
Cav sin obts	20551

Tabla 26: Numero de secuencias obtenidas en el Alineamiento del RDP.

#### 4. RESULTADOS

Los valores obtenidos correspondientes a las curvas de rarefacción de los seis subgrupos estudiados según el estado cariogénico, se unieron utilizando el programa aRarefactWin para crear una gráfica con todas las curvas juntas:

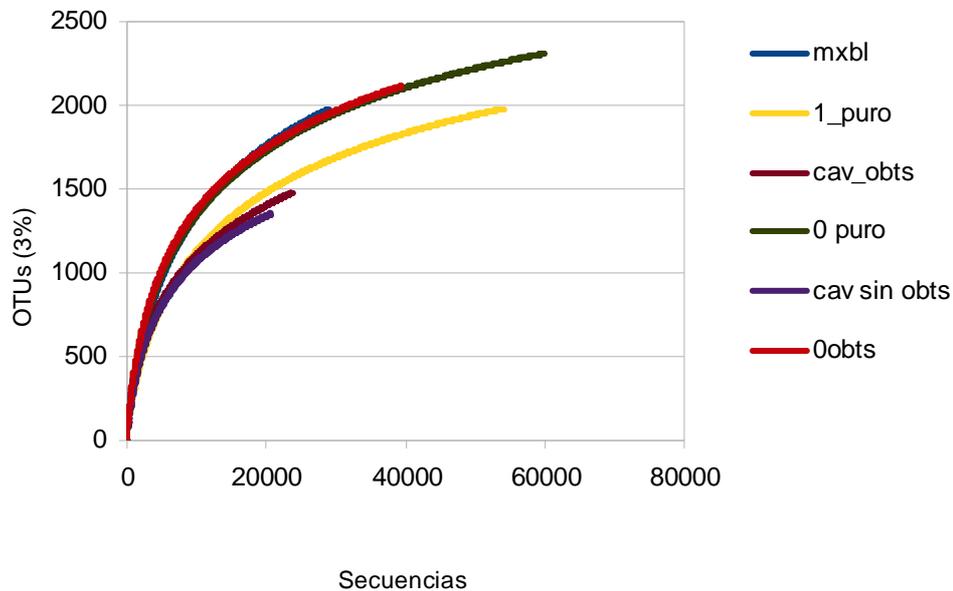


Figura 28: Curva de rarefacción de las muestras de saliva no estimulada de todos los pacientes estudiados.

Subgrupo estudiado	Nº secuencias	OTUs 3%
0 puro	60000	2250
0+obts	40000	2100
1 puro	55000	2000
Mxbl+obts	~30000	2000
Cav+obts	25000	1500
Cav sin obts	20000	1350

Tabla 27: Subgrupo estudiado con el número de secuencias obtenidas tras el análisis con RDP y número de OTUs reconocidos a un nivel de similitud del 3%.

La Figura 28 muestra las curvas de rarefacción de todas las muestras de saliva no estimulada en los distintos grupos de pacientes estudiados. El eje horizontal muestra el número de secuencias que han sido obtenidas mediante el estudio de pirosecuenciación

del gen del 16S y el eje vertical el número de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) a un nivel de similitud del 3% de las secuencias entre sí, lo que representa una aproximación del número de especies según el esfuerzo de secuenciación realizado.

La curva que representa los pacientes sanos sin antecedentes de la enfermedad (0 puro) se estabiliza a 2250 OTUs con 60000 secuencias, mostrando la mayor diversidad bacteriana de todos los grupos. Las curvas del resto de grupos se estabilizan a menor número de secuencias y menor número de OTUs, y van disminuyendo de forma progresiva, con lo que la diversidad bacteriana disminuye a medida que empeora el estado de salud.

#### 4.2.- ESTUDIO EN MUESTRAS DE SALIVA ESTIMULADA-NO ESTIMULADA.

Tras el estudio mediante la base de datos Ribosomal Database Project (RDP), se obtuvieron las secuencias de cada una de las muestras estudiadas, las cuáles fueron clasificadas a nivel de clase y género. En cada uno de estas categorías, se almacenaron los resultados en formato Excel, para su posterior distribución en gráficas porcentuales, las cuáles son recogidas a continuación:

##### 4.2.1- RESULTADOS OBTENIDOS TRAS ANALISIS Y PIROSECUENCIACION.

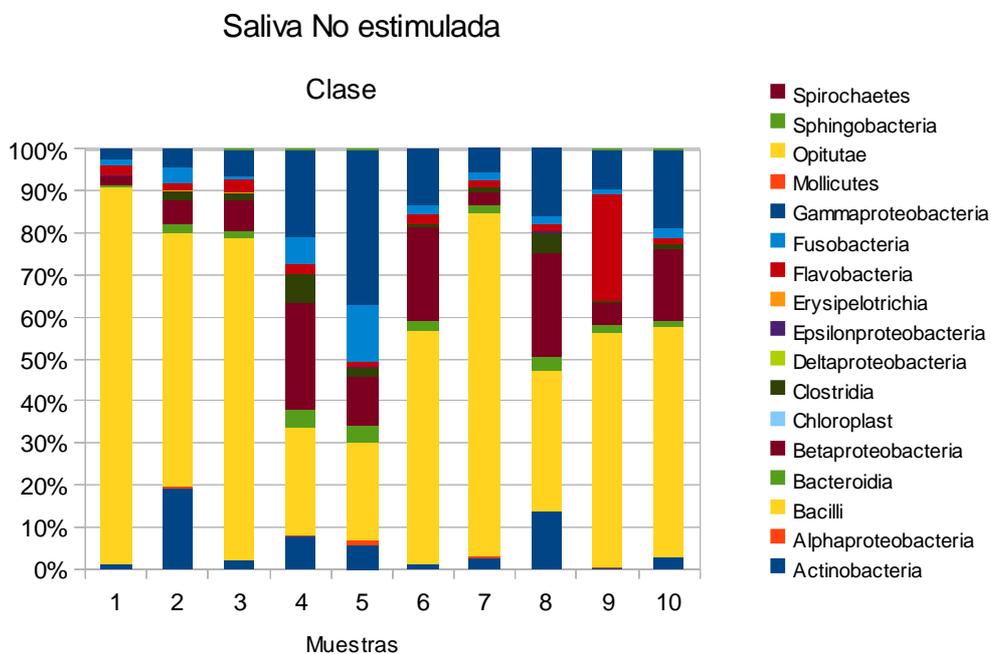


Figura 29: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva no estimulada de los pacientes seleccionados para el estudio comparativo entre saliva no estimulada y estimulada de la EECV-2010.

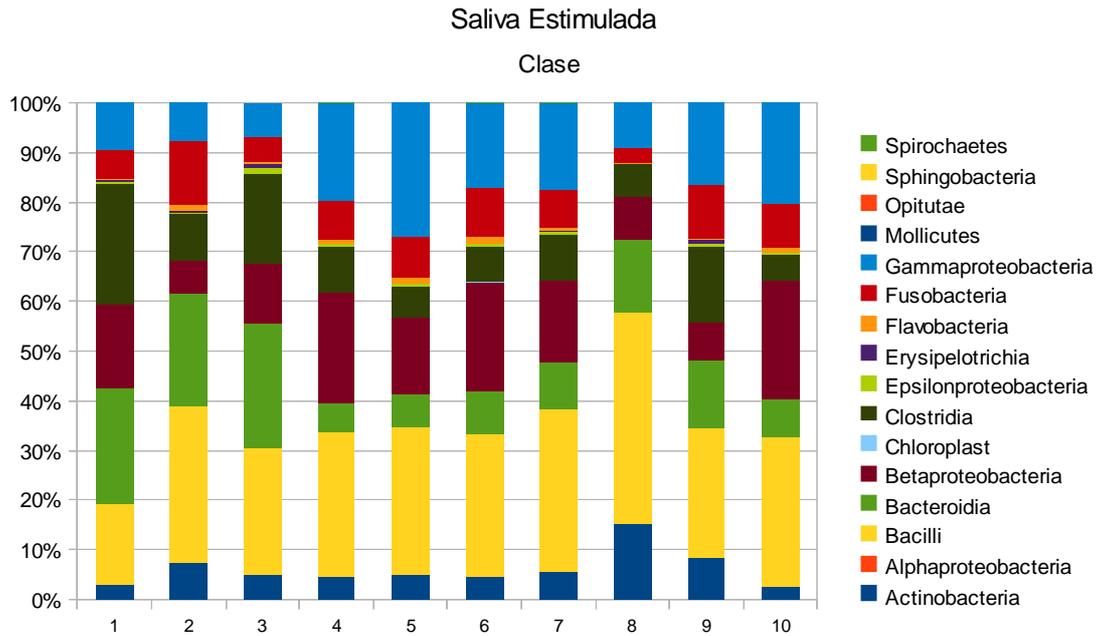


Figura 30: Análisis taxonómico a nivel de clase de las muestras de saliva estimulada de los pacientes seleccionados para el estudio comparativo entre saliva no estimulada y estimulada de la EECV-2010.

A nivel de clase, se observan diferencias en la distribución de las especies bacterianas entre las muestras de saliva estimulada y no estimulada. La proporción de *Bacilli* en saliva estimulada varía de un 15 a un 40 %, mientras que en las muestras de saliva no estimulada de los mismos pacientes, son predominantes superando un 50% del total en 7 de los 10 pacientes estudiados (Figura 29 y 30).

En el análisis de la saliva estimulada, hay una distribución variable de *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Betaproteobacteria*, *Clostridia* y *Gammaproteobacteria*, siendo estos los grupos dominantes. *Actinobacteria* aparece en menor proporción junto con *Fusobacteria* (Figura 30).

Por otro lado, *Bacilli* es la clase dominante en la mayor de las muestras de saliva no estimulada, excepto en algunas muestras donde se observa un aumento de *Gammaproteobacteria* (muestra 5), combinación de *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* (4, 6, 8 y 10) y un aumento de *Flavobacteria* (muestra 9) (Figura 29).

Estos resultados muestran una sobrerrepresentación del grupo *Bacilli* en saliva no estimulada respecto a la estimulada donde existe una mayor variabilidad entre la distribución de las especies microbianas.

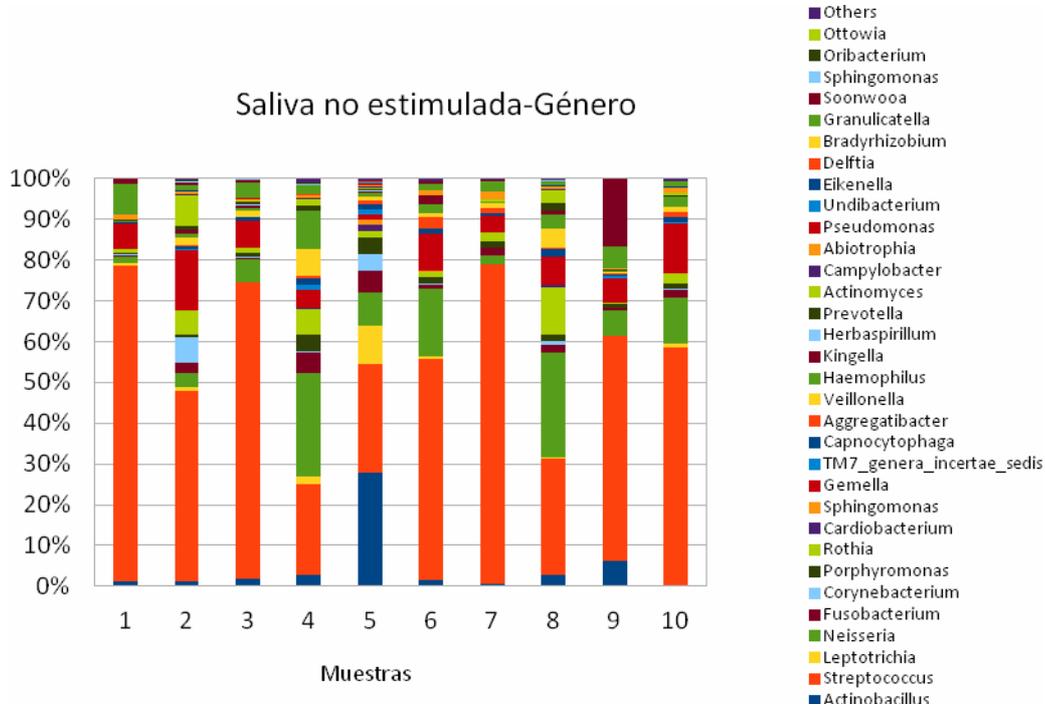


Figura 31: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva no estimulada de los pacientes seleccionados para el estudio comparativo entre saliva no estimulada y estimulada de la EECV-2010.

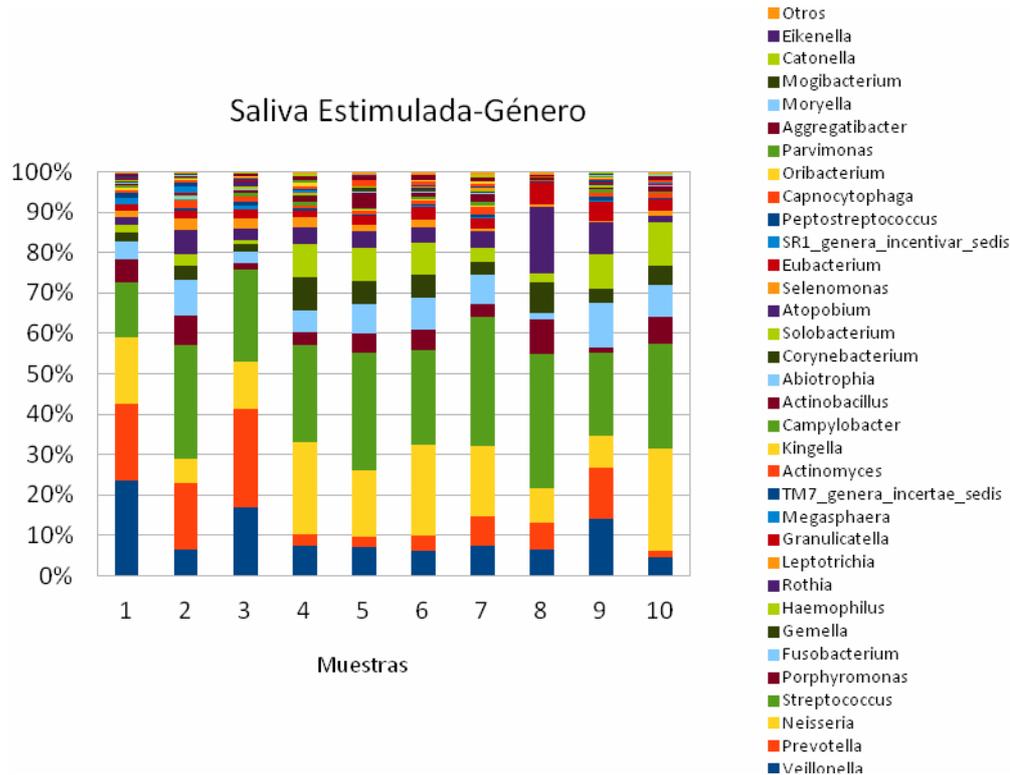


Figura 32: Análisis taxonómico a nivel de género de las muestras de saliva estimulada de los pacientes seleccionados para el estudio comparativo entre saliva no estimulada y estimulada de la EECV-2010.

En cuanto al género, los resultados se correlacionan con los obtenidos a nivel de clase. *Streptococcus* ocupa entre un 20-35% del total de las especies encontradas, seguido de *Neisseria* (7-25% del total), *Prevotella* (2-25%) y *Veillonella* (6-22%). Cabe destacar la presencia de *Fusobacteria*, sin sobrepasar el 10% del total; y de *Porphyromonas*, siendo el máximo detectado un 7 % del total, las cuales son subgingivales, así como TM7 el cual aparece entre el 0.15 y 1.27 % (Figura 31). Estas especies aparecen en menor cantidad en el análisis de saliva no estimulada, lo que hace sospechar de una liberación de placa bacteriana subgingival durante la masticación de la parafina en la recogida de saliva estimulada.

En cambio, el género *Streptococcus* es el más abundante en las muestras de saliva no estimulada superando el 50% del total excepto en las muestras 4 y 8, en las que el género *Neisseria* alcanza un 25 % de abundancia, y en la muestra 5 son los *Actinobacillus* los que aparecen en un 28 % del total (Figura 32). Las proporciones de *Porphyromonas* y *Fusobacteria* son inferiores a la obtenidas con saliva estimulada

#### 4. RESULTADOS

(entre 1-5% y 0-6%, respectivamente), y el género TM7 entre 0 y 1.39%. *Gemella* oscila entre el 1% (muestra 5) y casi un 16% (muestra 2) en saliva no estimulada y un 2 a 8% en estimulada (muestras 2 y 3, respectivamente), siendo esta variabilidad muy ligera.

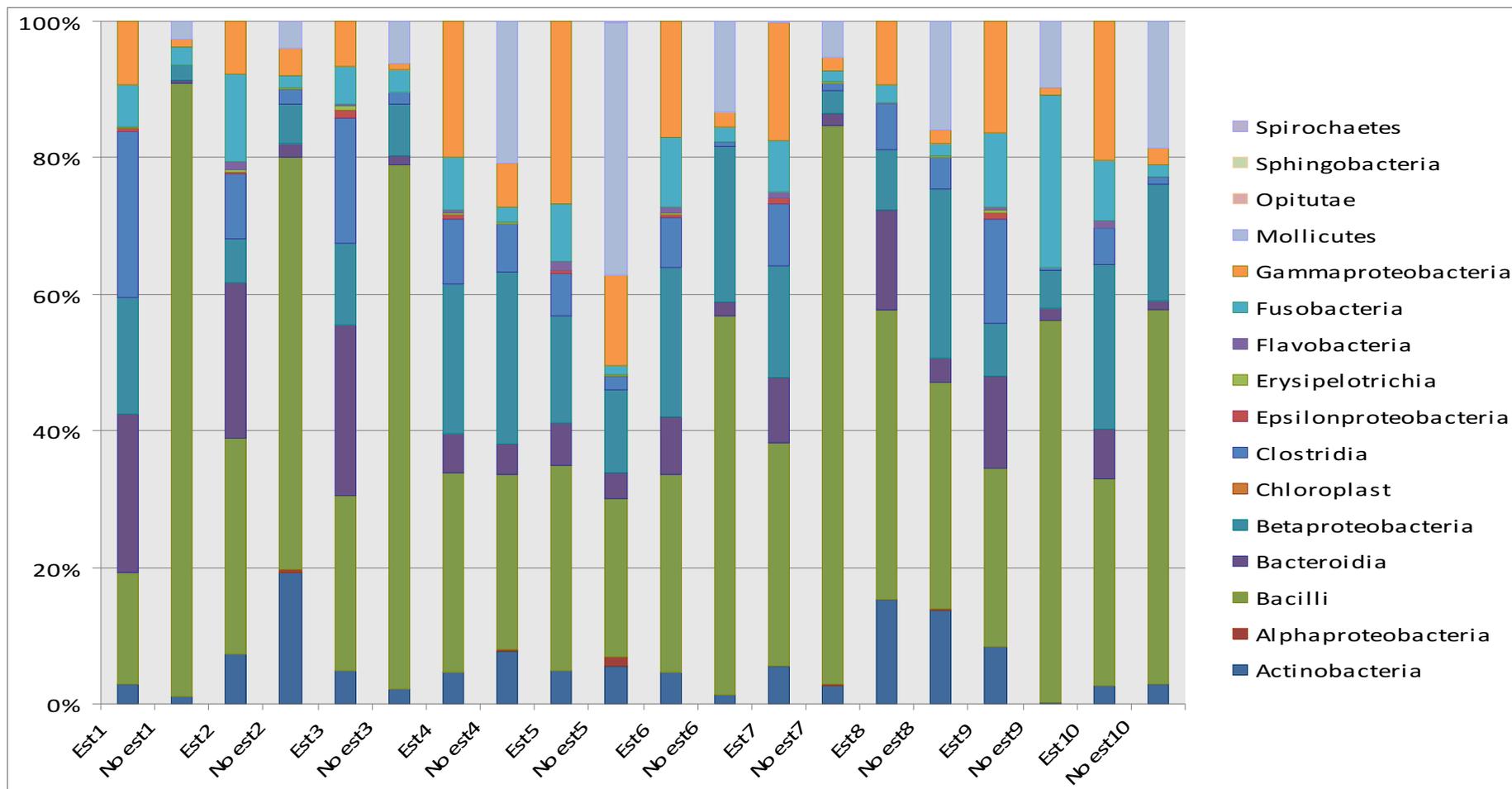


Figura 33: Comparativa a nivel taxonómico de clase entre las muestras de saliva estimulada y no estimulada.

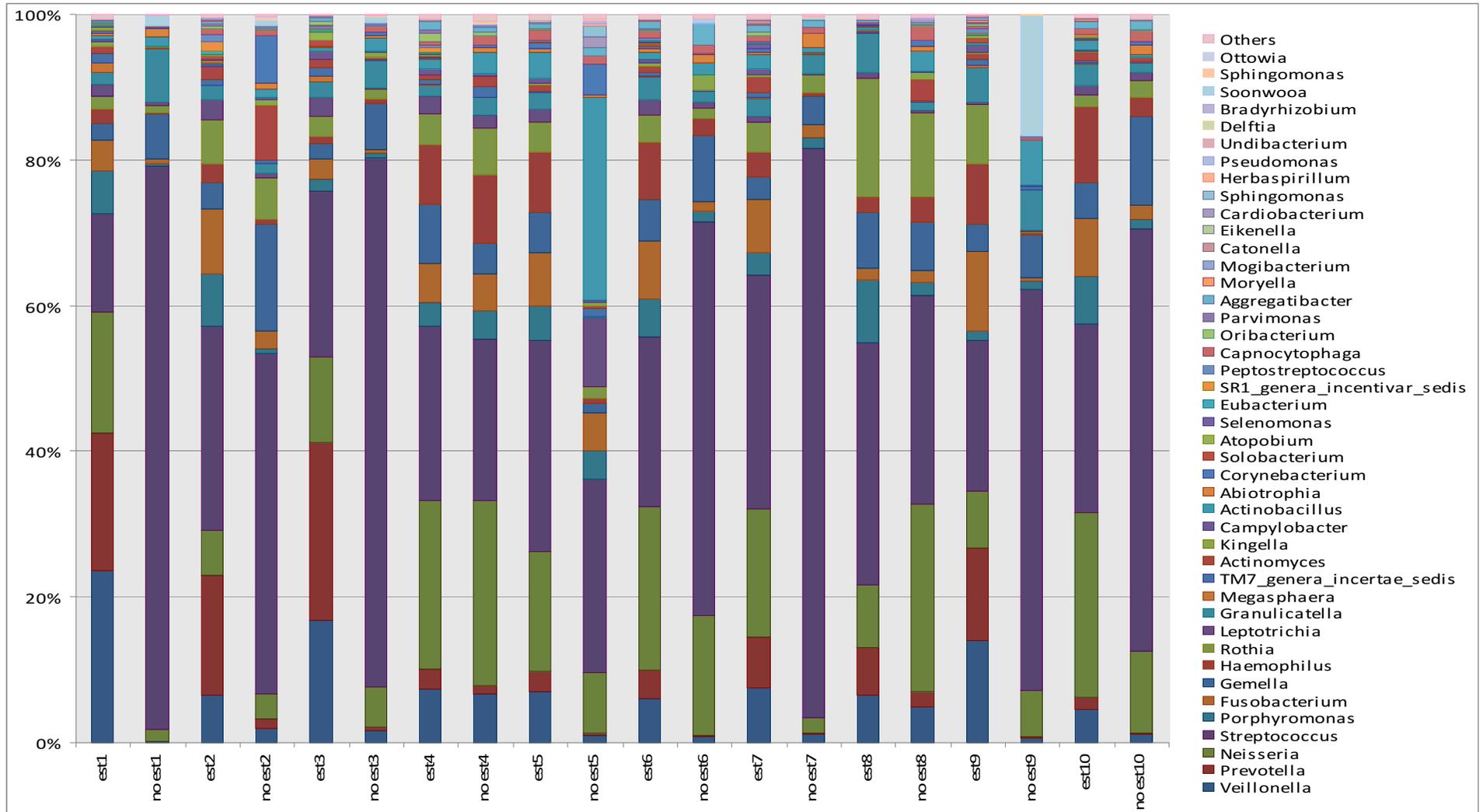


Figura 34: Comparativa a nivel taxonómico de género entre las muestras de saliva estimulada y no estimulada.

## 4.2.2- CURVAS DE RAREFRACCION.

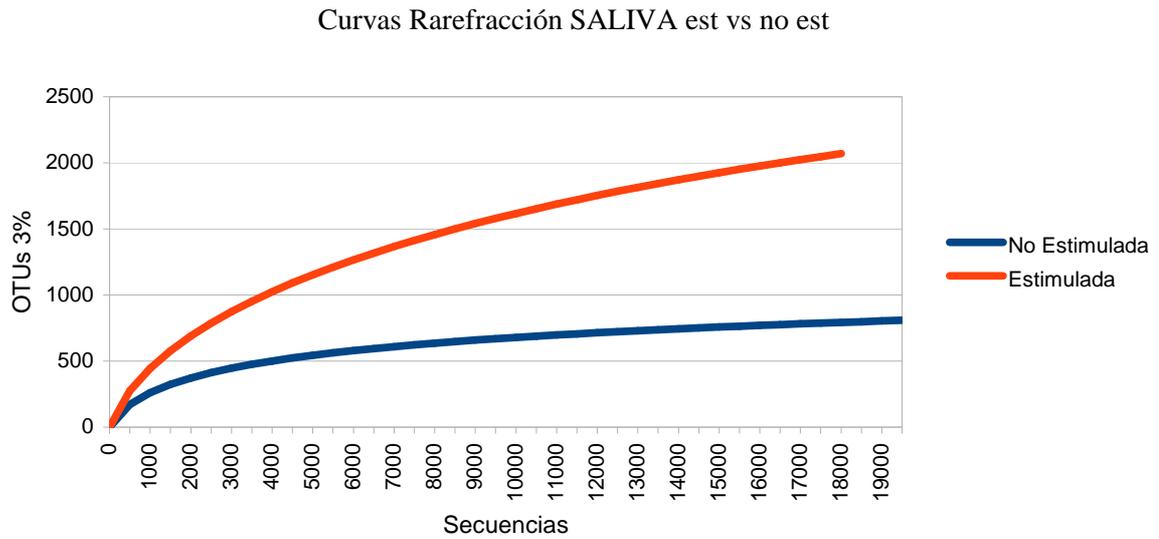


Figura 35: Curva de rarefacción comparativa de las muestras de saliva estimulada y no estimulada.

En la Figura 35, se compara mediante dos curvas de rarefacción con los datos para la divergencia del 3% del gen del 16S para establecer el número aproximado de especies (filotipos u OTUs). La curva de saliva no estimulada se estabiliza a 700 especies bacterianas, mientras que la saliva estimulada se estabiliza a más de 2000, indicando que con este tipo de muestra existe una mayor diversidad bacteriana, superior al triple que con saliva estimulada.

## 4.2.4-TABLAS LOCALIZACIONES ORALES DE LOS TIPOS BACTERIANOS.

Genus	Proporción (1:1000)	Localización						
		Dorso lengua	Cara lateral Lengua	Paladar Blando	Paladar duro	Mucosas	Pb supra	Pb sub
Streptococcus	519.6206	x	x	x	x	x	x	x
Neisseria	105.99254	x	x	x	x	x	x	x
Gemella	70.945624	x	x	x	x	x	x	x
Actinobacillus	46.52027							x
Rothia	33.980458	x	x	x			x	x
Granulicatella	27.15163	x	x	x	x	x	x	x
Fusobacterium	20.623977	x	x		x	x	x	x
Haemophilus	20.41756					x		
Soonwooa	19.936815							
Veillonella	19.878733	x	x	x	x	x	x	x
Porphyromonas	16.588514	x	x	x	x	x	x	x
Leptotrichia	15.303516	x	x			x	x	x
Actinomyces	13.746371	x					x	
Corynebacterium	13.055682						x	
Capnocytophaga	10.008979						x	x
Abiotrophia	8.5395479						x	x
Aggregatibacter	7.6374741	x						x
Prevotella	6.1875023	x	x	x	x	x	x	x
Kingella	5.501045						x	x
Others	4.1519201							
TM7_genera_in certae_sedis	3.9473565						x	x
Cardiobacterium	2.4678039							x
Sphingomonas	1.9487155							
Campylobacter	1.1617676	x	x	x	x	x	x	x

Tabla 28: Procedencia de los géneros bacterianos más abundantes en las muestras de saliva no estimulada.

#### 4. RESULTADOS

Genus	Proporción (1:1000)	Localización						
		Dorso lengua	Cara lateral Lengua	Paladar Blando	Paladar duro	Muco sas	Pb supra	Pb sub
Streptococcus	253.0726916	x	x	x	x	x	x	x
Neisseria	155.4273315	x	x	x	x	x	x	x
Veillonella	99.65263701	x	x	x	x	x	x	x
Prevotella	97.52180099	x	x	x	x	x	x	x
Fusobacterium	64.68747204	x	x		x	x	x	x
Haemophilus	54.61566702					x		
Rothia	52.57207565	x	x	x			x	x
Porphyromonas	46.90576377	x	x	x	x	x	x	x
Gemella	46.53449692	x	x	x	x	x	x	x
Granulicatella	27.91867135	x	x	x	x	x	x	x
Leptotrichia	16.69270149	x	x			x	x	x
Actinobacillus	10.62993872							x
Actinomyces	10.61787095	x					x	
TM7_genera_incerta e_sedis	6.516386153						x	x
Capnocytophaga	5.948814067						x	x
Campylobacter	5.78331939	x	x	x	x	x	x	x
Aggregatibacter	5.763002989	x						x
Others	5.352912731							
Oribacterium	3.161129818							
Abiotrophia	3.103611597						x	x
Peptostreptococcus	3.065217449	x	x					x
SR1_genera_incentiv ar_sedis	3.025419989							
Megasphaera	2.855688134					x		
Solobacterium	2.756133212	x		x		x	x	x
Corynebacterium	2.643953763						x	
Atopobium	1.988826098	x			x			
Kingella	1.971309032						x	x
Catonella	1.62722774	x		x				
Selenomonas	1.558687298							x
Parvimonas	1.536887655	x			x	x	x	x
Eubacterium	1.514180086	x	x	x	x			x
Moryella	1.226943026							

Tabla 29: Procedencia de los géneros bacterianos más abundantes en las muestras de saliva estimulada.

La procedencia de los géneros taxonómicos encontrados en saliva no estimulada y estimulada aparece reflejados en las tablas 28 y 29. Todos los encontrados en saliva no

estimulada aparecen también en la estimulada pero con distintas proporciones, las cuales ya han sido descritas anteriormente (Tablas 28 y 29).

Cabe destacar que los géneros detectados en las muestras de saliva no estimulada han sido previamente aislados en las distintas localizaciones (Aas y cols, 2005; Paster, 2001; Tanner, 2006; Preza, 2009). La procedencia de estos microorganismos es generalmente de dorso y cara lateral de lengua, paladar duro y blando, mucosas y placa bacteriana supra y subgingival. Cabe destacar que los géneros *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Capnocytophaga* y *Abiotrophia* son específicos de la placa dental, supragingival todos ellos y de ambos, los dos últimos. Además, aparecen dos géneros bacterianos de origen subgingival (*Actinobacillus* y *Cardiobacterium*) en saliva no estimulada (Tabla 28).

Entre los géneros bacterianos que han sido detectados solo en saliva estimulada, proceden del dorso de la lengua (*Peptostreptococcus*, *Solobacterium*, *Atopobium*, *Catonella*, *Parvimonas*, *Eubacterium*); cara lateral de la lengua (*Peptostreptococcus*, *Eubacterium*), paladar blando (*Solobacterium*, *Catonella*, *Eubacterium*); paladar duro (*Atopobium*, *Parvimonas*, *Eubacterium*); mucosas (*Megasphaera*, *Solobacterium* *Parvimonas*), placa supragingival (*Solobacterium*, *Parvimonas*) y de placa subgingival (*Peptostreptococcus*, *Solobacterium* *Parvimonas*, *Eubacterium*). El dorso de la lengua y el origen subgingival es compartido en *Peptostreptococcus*, *Solobacterium* *Parvimonas*, *Eubacterium*, siendo estas dos procedencias las más comunes en los géneros bacterianos que han sido detectados en saliva estimulada y no estimulada (Tabla 29).

### 4.3- . ESTUDIO ESTADÍSTICO

#### 4.3.1. SALIVA NO ESTIMULADA

Se realizó un estudio estadístico descriptivo mediante el programa SPSS version 19.0 comparando los datos mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) y análisis de medias.

4.3.1.1 Análisis descriptivo de los porcentajes de las distintas clases bacterianas obtenido tras el estudio mediante RDP.

#### 4. RESULTADOS

Clase	0 puro Media (ds)	0 + obts Media (ds)	1 puro Media (ds)	Mxbl+obts Media (ds)	Cav sin obts Media (ds)	Cav + obts Media (ds)	P< 0,05
Bacilli	44,84 (30,86)	57,91 (26,05)	63,06 (30,03)	62,01 (25,84)	41,79 (29,19)	35,66 (32,69)	0,050*
Betaproteobacteria	6,17 (8,01)	3,87 (5,48)	5,7 (7,19)	5,99 (6,9)	2,9 (3,08)	2,78 (4,4)	0,464
Gammaproteobacteria	15,73 (21,17)	16,22 (20,86)	8,63 (10,99)	4,38 (6,22)	11,37 (17,69)	6,51 (11,86)	0,015*
Flavobacteria	22,68 (31,08)	3,41 (6,5)	6,58 (14,32)	5,44 (9,97)	18,54 (24,81)	15,46 (25,64)	0,019*
Actinobacteria	2,91 (5,22)	1,61 (2,72)	0,88 (1,27)	1,69 (2,49)	2,26 (8,25)	0,8 (2,03)	0,050*
Clostridia	1,49 (1,87)	0,88 (0,92)	0,63 (1,49)	5,37 (7,09)	2,03 (1,98)	1,64 (1,67)	0,006*
Bacteroidia	3,1731 (4,24767)	5,3952 (7,82898)	4,8799 (10,39301)	3,9262 (4,38671)	7,7089 (7,26987)	10,8086 (15,79168)	0,074
Fusobacteria	2,67 (3,57)	5,4 (6,67)	3,43 (5,05)	4,95 (5,06)	6,6 (6,87)	6,76 (13,63)	0,161
Alphaproteobacteria	0,13 (0,32)	0,2 (0,45)	0,03 (0,05)	0,13 (0,29)	0,2 (0,31)	0,43 (0,96)	0,626
Epsilonproteobacteria	0,15 (0,2)	0,08 (0,16)	0,42 (1,6)	0,17 (0,29)	0,6 (1,12)	0,3 (0,61)	0,080
Sphingobacteria	0,02 (0,04)	0,003 (0,01)	0,005 (0,02)	0,002 (0,007)	0,01 (0,03)	0,01 (0,04)	0,148
Deltaproteobacteria	0,01 (0,02)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,020*
Erysipelotrichia	0,01 (0,01)	0,004 (0,01)	0,002 (0,007)	0,02 (0,07)	0,004 (0,017)	0,003 (0,012)	0,618
Spirochaetes	0,01 (0,02)	0,006 (0,01)	0,18 (0,74)	0,02 (0,04)	0,08 (0,29)	0,03 (0,076)	0,937
Mollicutes	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,002 (0,006)	0,331

Tabla 30: Media de porcentajes (%) a nivel de clase, desviación estándar y significación estadística (Kruskal Wallis,\* p< 0.05 presenta diferencias estadísticamente significativas).

La tabla 30 muestra los distintos porcentajes a nivel de clase. En ella podemos observar variaciones entre las distintas clases en función del subgrupo estudiado, siendo representadas en la gráfica 1 las que presentan diferencias estadísticamente significativas:

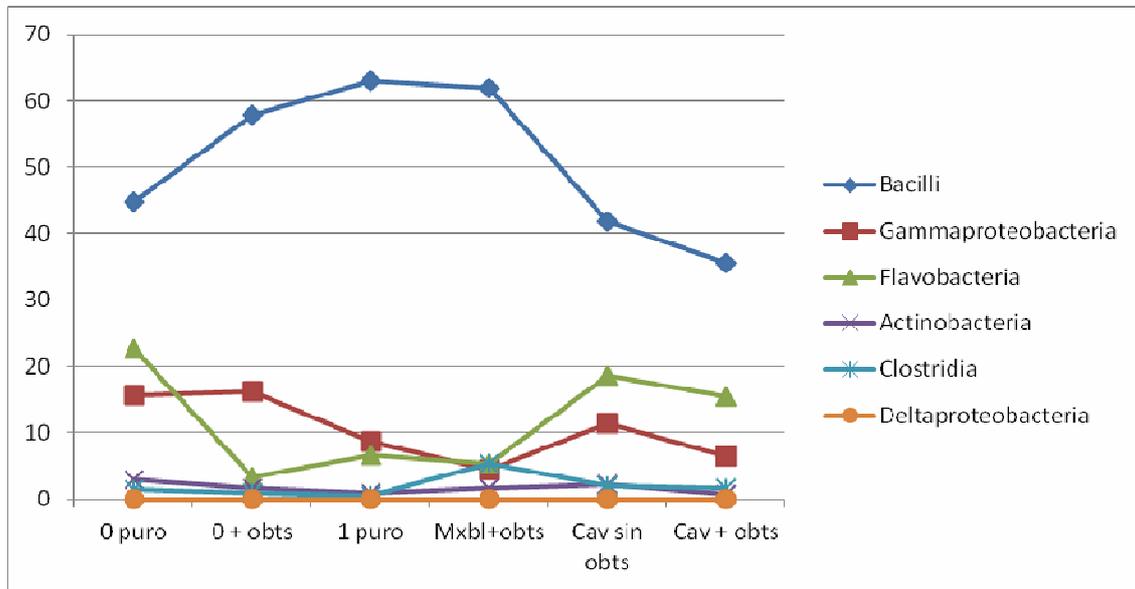


Figura 36: Se representa las medias de los porcentajes de las clases bacterianas que poseen diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos estudiados entre sí.

En la Figura 36 se observa un patrón para la clase Bacilli con aumento de la misma en los pacientes con lesiones iniciales de caries (1 puro y mxbl+obts) superando el 60%, respecto a los pacientes sin lesiones actuales de la enfermedad (0 puro y 0+obts, 45% y 59%, respectivamente), y descenso acusado en los pacientes con lesiones cavitadas (41% y 37%, respectivamente) respecto a los sanos y con lesiones iniciales.

La clase Gammaproteobacteria presenta niveles más elevados en los pacientes sin lesiones actuales de la enfermedad, descendiendo en aquellos que poseen lesiones iniciales y sufre un ligero aumento en los pacientes con lesiones cavitadas (18%, 10%-5% y 11-7%).

La clase Flavobacteria presenta un patrón distinto a las demás, con su máximo valor en los pacientes sanos y sin antecedentes (alrededor de 22%); descenso brusco en aquellos sin lesiones actuales pero con antecedentes de la enfermedad (3%); ligero aumento (sobre 8%) en los pacientes con lesiones iniciales con y sin antecedentes de la enfermedad; y finalmente, ascenso hasta 19-15% en los pacientes con lesiones cavitadas sin y con antecedentes.

#### 4. RESULTADOS

Las clases bacterianas Actinobacteria, Clostridia y Deltaproteobacteria aparecen en proporciones muy bajas pero con diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos. El grupo de pacientes sanos posee el mayor porcentaje de Actinobacteria respecto al resto de grupos, siendo los menores los pacientes con lesiones iniciales sin antecedentes y aquellos con cavidades y antecedentes. La clase Clostridia muestra diferencias estadísticamente significativas porque en el subgrupo de pacientes con lesiones iniciales y antecedentes de la enfermedad (mxbl+obts) su valor es muy superior a los demás grupos (5,37% respecto a valores entre 2,03-0,88%). Finalmente, la clase Deltaproteobacteria solamente aparece en los pacientes sanos sin antecedentes y no el resto de grupos, aunque en una proporción muy baja (0,01%).

4.3.1.2- Análisis descriptivo de los porcentajes de los distintos géneros bacterianos obtenidos tras el estudio mediante RDP.

Género	0 puro Media (ds)	0 + obts Media (ds)	1 puro Media (ds)	Mxbl+obts Media (ds)	Cav sin obts Media (ds)	Cav + obts Media (ds)	P< 0,05
Actinobacillus	10,65 (22,53)	8,99 (16,78)	3,55 (7,19)	1,01 (2,63)	8,03 (17,05)	3,57 (10,7)	0,004*
Streptococcus	44,89 (26,75)	53,28 (21,66)	60,42 (24,55)	61,29 (17,17)	43,3 (25,14)	43,82 (26,10)	0,120
Leptotrichia	1,03 (2,07)	1,86 (2,58)	1,27 (2,31)	2,43 (3,51)	3,27 (3,98)	1,69 (1,83)	0,027*
Neisseria	5,24 (7,72)	3,19 (4,24)	4,89 (7,21)	3,93 (6,42)	1,36 (1,51)	2,59 (4,58)	0,752
Fusobacterium	1,66 (2,15)	3,51 (4,97)	2,02 (2,86)	2,16 (2,34)	4,1 (6,14)	2,85 (2,67)	0,428
Corynebacterium	0,68 (1,66)	0,13 (0,22)	0,1 (0,27)	0,13 (0,24)	0,01 (0,04)	0,02 (0,04)	0,038*
Porphyromonas	1,89 (2,04)	2,21 (3,27)	2,21 (3,93)	1,51 (1,53)	5,45 (5,71)	7,41 (11,1)	0,027*
Rothia	1,77 (3,05)	1,53 (2,65)	0,6 (1)	1,46 (2,4)	2,29 (8,56)	0,78 (2,11)	0,056
Cardiobacterium	0,16 (0,33)	0,12 (0,27)	0,03 (0,06)	0,07 (0,13)	0,06 (0,075)	0,07 (0,2)	0,277
Gemella	4,76 (4,22)	9,67 (13,68)	8,32 (9,13)	6,86 (5,3)	3,55 (3,76)	4,83 (4,31)	0,163

#### 4. RESULTADOS

TM7_genera_incertae_sedis	0,97 (2,12)	0,16 (0,25)	0,08 (0,15)	0,14 (0,27)	0,26 (0,3)	0,49 (1)	0,098
Capnocytophaga	1,82 (2,73)	1,16 (1,61)	0,57 (1,45)	1,09 (1,43)	2,74 (3,63)	4,75 (6,97)	0,007*
Aggregatibacter	0,41 (0,64)	0,74 (1,524)	1,394 (5,245)	0,66 (1,36)	0,5 (1,13)	0,28 (0,73)	0,511
Veillonella	1,36 (1,79)	0,62 (0,84)	0,7 (1,8)	5,77 (7,97)	1,77 (1,61)	2,55 (3,99)	0,001*
Haemophilus	1,14 (2,13)	0,46 (0,58)	0,59 (1,04)	0,16 (0,22)	0,222 (0,422)	1,36 (4,09)	0,096
Kingella	0,24 (0,35)	0,2 (0,5)	0,04 (0,09)	0,12 (0,23)	0,31 (0,72)	0,17 (0,36)	0,302
Herbaspirillum	0,02 (0,08)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,014)	0,01 (0,02)	0,01 (0,04)	0,497
Prevotella	1,69 (4,63)	1,17 (1,33)	2,37 (7,73)	2,44 (3,79)	2,85 (4,13)	4,99 (10,66)	0,022*
Actinomyces	0,69 (1,75)	0,07 (0,14)	0,08 (0,26)	0,18 (0,25)	0,06 (0,21)	0,14 (0,24)	0,070
Campylobacter	0,24 (0,41)	0,15 (0,26)	0,51 (1,87)	0,2 (0,33)	0,81 (1,31)	0,59 (1,11)	0,193
Abiotrophia	0,39 (0,45)	0,75 (0,95)	0,62 (0,98)	0,87 (1,77)	0,42 (0,37)	0,56 (1,06)	0,810
Pseudomonas	0,05 (0,07)	0,01 (0,02)	0,003 (0,01)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,03)	0,000*
Undibacterium	0,01 (0,03)	0,001 (0,01)	0,004 (0,02)	0 (0)	0 (0)	0,01 (0,04)	0,459
Eikenella	0,05 (0,07)	0,02 (0,04)	0,04 (0,1)	0,03 (0,09)	0,03 (0,08)	0,01 (0,04)	0,179
Delftia	0,02 (0,05)	0,005 (0,02)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,338
Bradyrhizobium	0,006 (0,03)	0,002 (0,008)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,667
Granulicatella	2,7 (2,61)	8,64 (13,13)	5,82 (4,81)	3,28 (2,5)	4,45 (5,71)	4,87 (5,35)	0,371
Soonwooa	14,42 (22,46)	0,37 (0,61)	2,73 (8,46)	2,73 (7,41)	11,27 (21,72)	9,73 (19,05)	0,018*
Sphingomonas	0,05 (0,07)	0,1 (0,31)	0,02 (0,04)	0,12 (0,29)	0,21 (0,31)	0,52 (0,95)	0,177
Oribacterium	0,04 (0,11)	0,01 (0,03)	0 (0)	0,02 (0,078)	0,07 (0,22)	0,02 (0,07)	0,277
Ottowia	0,03 (0,07)	0 (0)	0 (0)	0,06 (0,2)	0,02 (0,09)	0,02 (0,05)	0,107
Otros	0,85 (2,29)	0,75 (0,85)	1,02 (2,55)	1,26 (2,23)	2,59 (3,91)	1,28 (2,14)	0,008*

Tabla 31: Media de porcentajes a nivel de género, desviación estándar y significación estadística (Kruskal Wallis,\*  $p < 0.05$  presenta diferencias estadísticamente significativas).

La tabla 31 recoge las medias de porcentajes a nivel de género bacteriano en los distintos subgrupos estudiados. Podemos destacar la variación porcentual del género *Streptococcus* el cuál alcanza unos valores alrededor de 50% en los pacientes sanos con y sin antecedentes de la enfermedad, aumenta su porcentaje hasta 61% en aquellos con lesiones iniciales con y sin antecedentes, y finalmente, desciende hasta un 43% en aquellos con lesiones cavitadas.

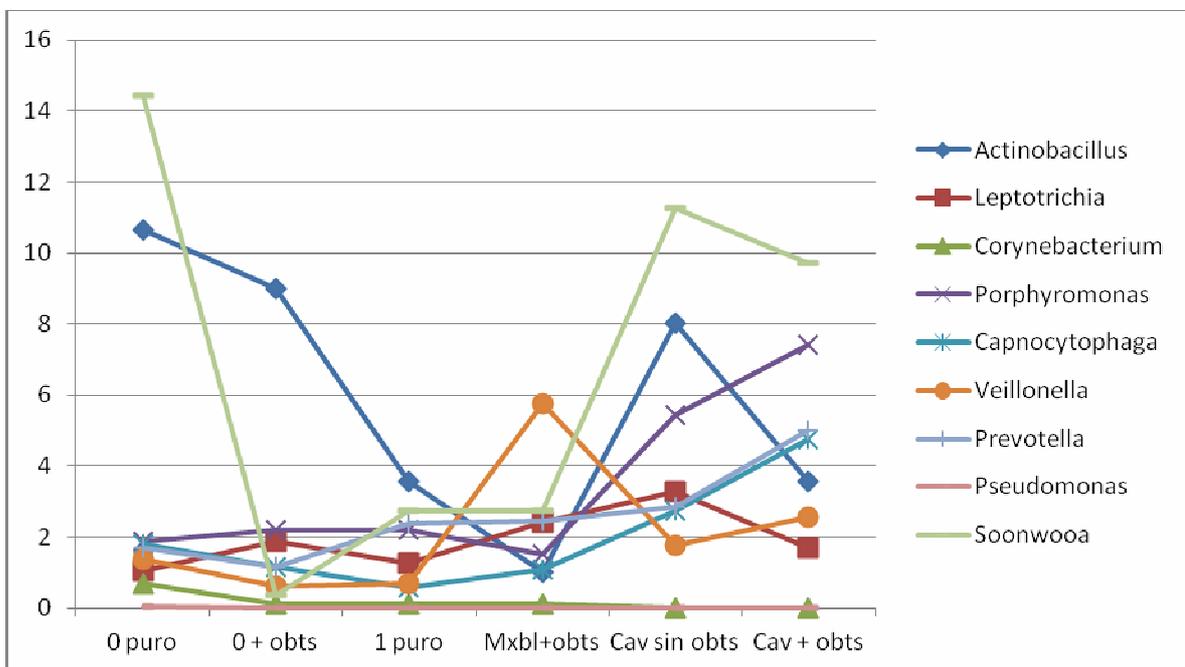


Figura 37: Se representa las medias de los porcentajes de los géneros bacterianos que poseen diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos estudiados entre sí.

El género *Actinobacillus* posee valores superiores en los pacientes sanos, mientras que estos descienden bruscamente en aquellos con lesiones iniciales, para incrementar de nuevo su valor en los pacientes con cavidades sin antecedentes y volver a disminuir en los que tienen lesiones cavitadas con antecedentes.

El género *Soonwooa* sigue un patrón similar a la clase Flavobacteria (Figura 37 y Figura 36, respectivamente), ya que este género pertenece a dicha clase y confirma la distribución de porcentajes de Flavobacteria.

Los géneros *Porphyromonas*, *Capnocytophaga* y *Prevotella* aumentan sus porcentajes en los grupos de pacientes con lesiones cavitadas con y sin antecedentes de la enfermedad respecto al resto de grupos.

El género *Veillonella* destaca porque sufre un aumento brusco en los pacientes con lesiones iniciales con antecedentes de la enfermedad respecto al resto de grupos estudiados.

#### 4.3.2. SALIVA ESTIMULADA VS NO ESTIMULADA

4.3.2.1 Análisis descriptivo de los porcentajes de las distintas clases bacterianas obtenido tras el estudio mediante RDP.

Clase	Saliva estimulada Media (ds)	Saliva no estimulada Media (ds)	P < 0,05
Actinobacteria	6,1 (3,65)	5,66 (6,27)	0,445
Alphaproteobacteria	0,003 (0,009)	0,26 (0,42)	0,008*
Bacilli	29,31 (6,52)	55,68 (23,05)	0,028*
Bacteriodia	13,68 (7,53)	2,29 (1,23)	0,005*
Betaproteobacteria	15,19 (6,31)	12,57 (9,15)	0,241
Clostridia	0,004 (0,01)	0 (0)	0,317
Epsilonbacteria	11,14 (6,18)	2,16 (2,11)	0,005*
Erysipelotrichia	0,52 (0,34)	0,014 (0,025)	0,007*
Flavobacteria	0,25 (0,25)	0,11 (0,1)	0,173
Fusobacteria	0,68 (0,42)	0,016 (0,02)	0,005*
Gammaproteobacteria	8,02 (2,85)	4,35 (7,38)	0,074
Mollicutes	15,1 (6,57)	3,51 (3,82)	0,005*
Optitutae	0,003 (0,009)	13,36 (10,44)	0,005*
Shingobacteria	0 (0)	0 (0)	1,000
Spirochaetes	0 (0)	0 (0)	1,000
Deltaproteobacteria	0,02 (0,04)	0,03 (0,05)	0,398

Tabla 32: Media de porcentajes (%) a nivel de clase, desviación estándar y significación estadística (Kruskal Wallis,\* p < 0.05 presenta diferencias estadísticamente significativas).

En la tabla 32 se recogen las medias de los porcentajes a nivel de clase de las muestras de saliva estimulada y no estimulada de los mismos pacientes. Cabe destacar que la clase bacteriana más abundante es Bacilli en ambos tipos de muestra, pero el valor es

casi el doble en saliva no estimulada respecto de la estimulada (55,68 y 29,31, respectivamente). Al igual que en el análisis por secuencias, los valores de cada clase bacteriana difieren en función de la muestra salival tomada, así en saliva estimulada son más abundantes *Actinobacteria*, *Bacteriodia*, *Betaproteobacteria*, *Clostridia*, *Epsilonbacteria*, *Erysipelotrichia*, *Flavobacteria*, *Fusobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Mollicuts*. Mientras que en saliva no estimulada *Alphaproteobacteria*, *Bacilli* y *Optitutae*.

Algunos de ellos poseen diferencias estadísticamente significativas al comparar las distintas proporciones entre sí. En la Figura 38 se representan las medias de los porcentajes de cada uno de los géneros con diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de muestra:

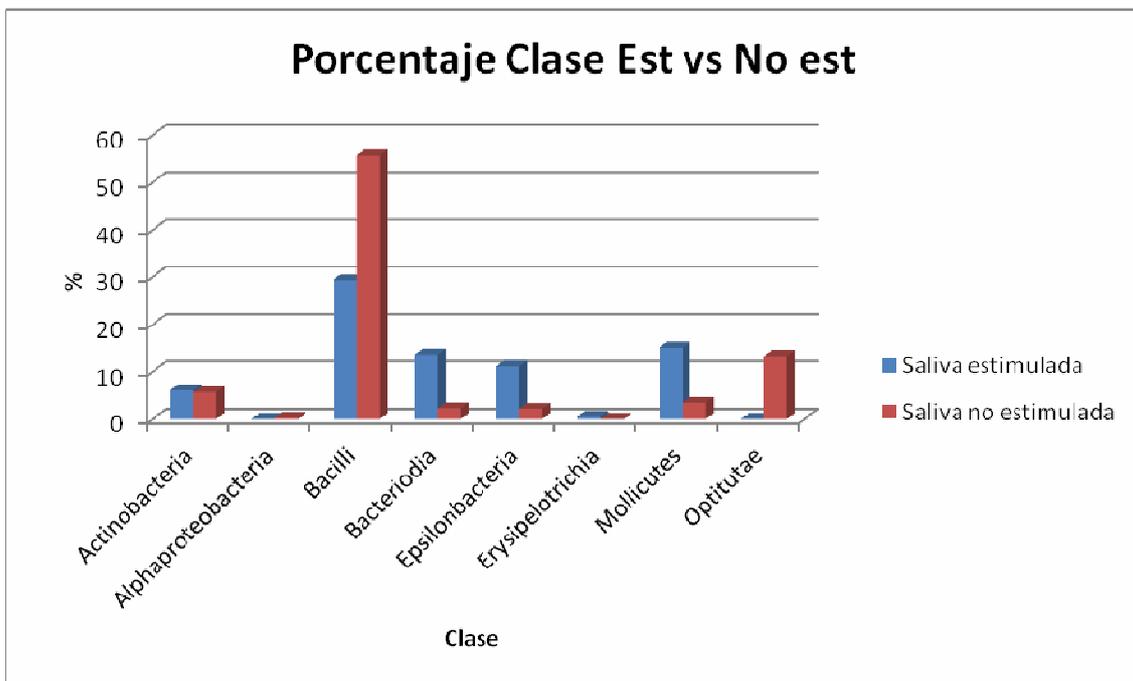


Figura 38: Se representa las medias de porcentajes de las clases bacterianas que poseen diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos estudiados entre sí.

4.3.2.2. Análisis descriptivo de los porcentajes de las distintas clases bacterianas obtenido tras el estudio mediante RDP.

Clase	Saliva estimulada Media (ds)	Saliva no estimulada Media (ds)	P < 0,05
Veillonella	9,97 (6,14)	1,99 (2,12)	0,005*

#### 4. RESULTADOS

Prevotella	9,75 (7,96)	0,62 (0,64)	0,005*
Neisseria	15,54 (6,85)	10,6 (9,07)	0,114
Streptococcus	25,31 (5,8)	51,96 (20,85)	0,028*
Porphyromonas	4,69 (2,35)	1,66 (1,26)	0,009*
Fusobacterium	6,47 (2,89)	2,06 (1,74)	0,007*
Gemella	4,65 (2,1)	7,09 (3,94)	0,139
Haemophilus	5,46 (3,47)	2,04 (2,79)	0,022*
Rothia	5,26 (4,33)	3,4 (3,53)	0,059
Leptotrichia	1,67 (0,84)	1,53 (2,84)	0,074
Granulicatella	2,79 (1,28)	2,72 (2,25)	0,646
Megasphaera	0,29 (0,45)	0 (0)	
TM7_genera_incertae_sedis	0,65 (0,38)	0,39 (0,49)	0,203
Actinomyces	1,06 (0,5)	1,37 (2,32)	0,878
Kingella	0,2 (0,2)	0,55 (0,67)	0,285
Campylobacter	0,58 (0,37)	0,12 (0,11)	0,013*
Actinobacillus	1,06 (1,067)	4,65 (8,36)	0,047*
Abiotrophia	0,31 (0,17)	0,85 (0,53)	0,009*
Corynebacterium	0,26 (0,27)	1,31 (2,22)	0,169
Solobacterium	0,28 (0,28)	0 (0)	0,012*
Atopobium	0,2 (0,32)	0 (0)	0,028*
Selenomonas	0,16 (0,22)	0 (0)	0,018*
Eubacterium	0,15 (0,14)	0 (0)	0,012*
SR1_genera_incertivar_sedis	0,3 (0,42)	0 (0)	0,008*
Peptostreptococcus	0,32 (0,29)	0 (0)	0,012*
Capnocytophaga	0,59 (0,41)	1 (0,51)	0,059
Oribacterium	0,32 (0,32)	0,09 (0,14)	0,017*
Parvimonas	0,15 (0,16)	0 (0)	0,012*
Aggregatibacter	0,58 (0,4)	0,76 (0,88)	0,646
Moryella	0,12 (0,1)	0 (0)	0,018*
Mogibacterium	0,09 (0,1)	0 (0)	0,018*
Catonella	0,16 (0,2)	0 (0)	0,008*
Eikenella	0,08 (0,1)	0,09 (0,07)	0,678
Cardiobacterium	0 (0)	0,25 (0,45)	0,018*
Sphingomonas	0 (0)	0,19 (0,43)	0,028*
Herbaspirillum	0 (0)	0,05 (0,11)	0,109
Pseudomonas	0 (0)	0,06 (0,08)	0,018*
Undibacterium	0 (0)	0,02 (0,05)	0,317
Delftia	0 (0)	0,03 (0,08)	0,180
Bradyrhizobium	0 (0)	0,02 (0,04)	0,180
Soonwooa	0 (0)	1,99 (5,1)	0,028*
Ottowia	0 (0)	0,1 (0,09)	0,018*
Otros	0 (0)	0,02 (0,05)	0,109

Tabla 33: Media de porcentajes (%) a nivel de género, desviación estándar y significación estadística (Kruskal Wallis,\*  $p < 0.05$  presenta diferencias estadísticamente significativas).

En la tabla 33 se muestran las medias de los porcentajes a nivel de género de las muestras de saliva estimulada y no estimulada de los mismos pacientes. Los géneros con mayor abundancia porcentual en saliva estimulada son: *Veillonella*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Leptotrichia*, *Granulicatella*, *Megasphaera*, *TM7\_genera\_incertae\_sedis*, *Campylobacter*, *Solobacterium*, *Atopobium*, *Selenomonas*, *Eubacterium*, *SRI\_genera\_incentivar\_sedis*, *Peptostreptococcus*, *Oribacterium*, *Parvimonas*, *Moryella*, *Mogibacterium* y *Catonella*. Mientras que en saliva no estimulada, son más abundantes *Streptococcus*, *Gemella*, *Actinobacillus*, *Abiotrophia*, *Corynebacterium*, *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Cardiobacterium*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Undibacterium*, *Delftia*, *Bradyrhizobium*, *Soonwooa*, *Ottowia* y *Otros*.

De estos géneros bacterianos, existen algunas diferencias estadísticas entre ambos tipos de muestra salival, las cuáles se recogen en la Figura 39:

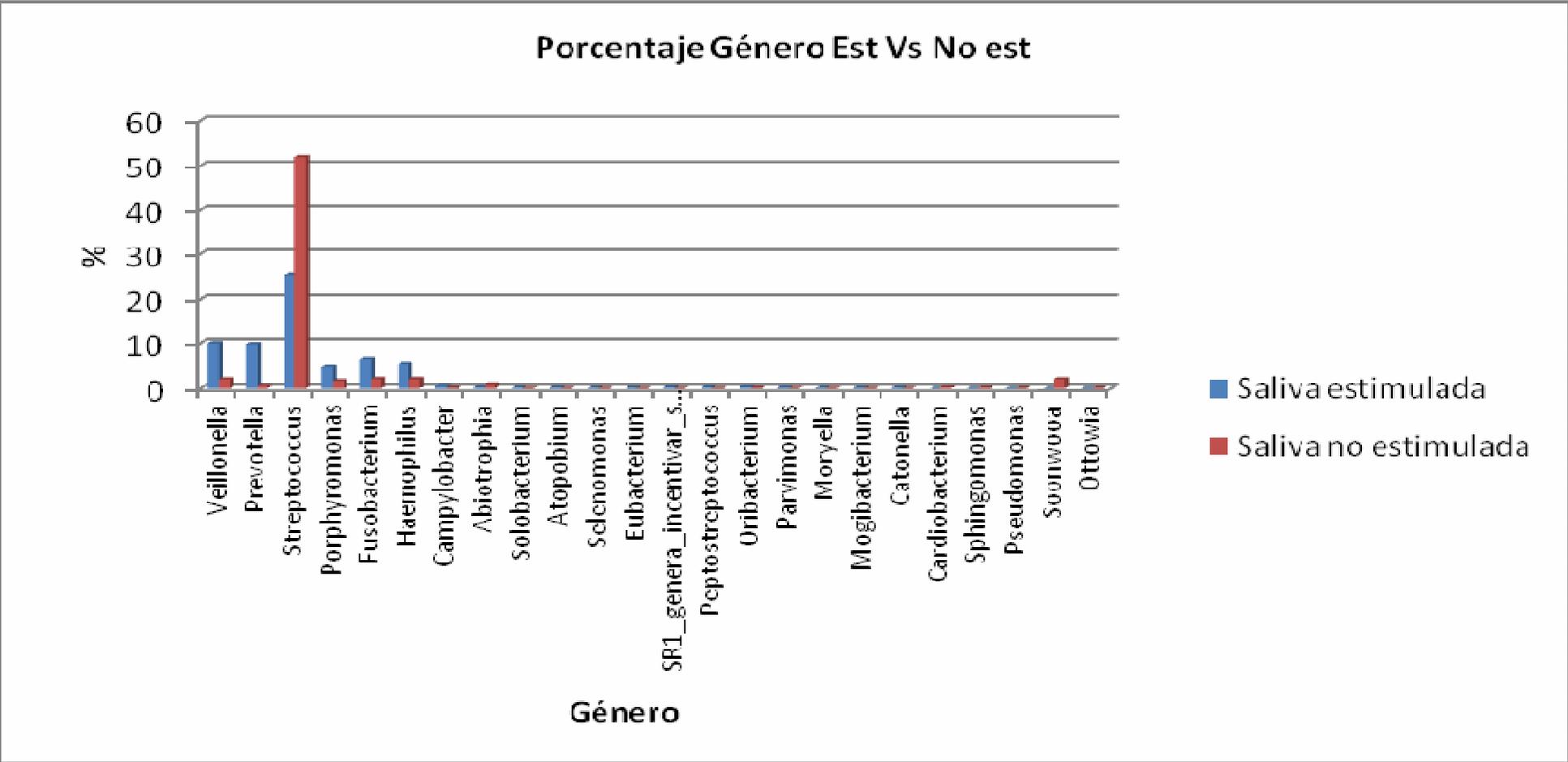


Figura 39: Se representa las medias de porcentajes de los géneros bacterianos que poseen diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos estudiados entre sí.



## **5. DISCUSIÓN**



### **5.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA.**

La obtención de muestras de saliva para el presente estudio se llevó a cabo durante el trabajo de campo del estudio epidemiológico de salud oral de los escolares de la Comunidad Valenciana en el año 2010.

Dicho estudio epidemiológico es descriptivo, de tipo transversal o de corte, también llamado de prevalencia. En él se analizaron, mediante una exploración directa, los principales rasgos y variables que definen el estado de salud bucodental dentro de una determinada población y en un momento dado.

El principal requisito para que un estudio de este tipo sea fiable es que la muestra sea totalmente representativa de la población diana sobre la que se quieren inferir las conclusiones a partir de los datos obtenidos, para ello es necesario la selección aleatoria de un grupo de individuos que representarán, a pequeña escala, y con muy ligeras variaciones debidas al azar, el conjunto de la población objeto del estudio. Una muestra de este tipo se denomina muestra de sesgo controlado.

Los criterios para la selección de las edades a explorar fueron estrictamente los recomendados por la Organización Mundial de la Salud. Este organismo recomienda los siguientes grupos: 5 años para los dientes primarios, 12 y 15 para los dientes permanentes. No obstante, la OMS también permite la utilización del grupo de los 6 años, dado que en ciertos países se produce el ingreso en la escuela a esta edad, como sucede en el nuestro. El grupo estudiado fue el de 12 años de edad ya que los dientes presentes en la cavidad oral son todos de la dentición permanente y permite valorar el estado de salud oral mediante el criterio ICDAS II.

Durante la exploración de los distintos parámetros de salud siguiendo las recomendaciones de la OMS, se recogieron muestras de saliva no estimulada de todos los pacientes para realizar el estudio de la microflora oral salivar según el estado de salud bucodental. Al mismo tiempo y de forma aleatoria, se recogieron muestras de saliva estimulada de algunos pacientes con el objetivo de comparar ambos tipos de muestra salival del mismo paciente.

En este grupo experimental se incluyeron 110 muestras de saliva no estimulada procedentes de niños de 12 años explorados en el Estudio Epidemiológico de Salud Oral

de la Comunidad Valenciana (EECV\_2010), de los cuáles, se seleccionaron de forma aleatoria 10 muestras de saliva estimulada recogidas durante el mismo estudio.

## **5.2.- ESTUDIO MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN DE SALIVA NO ESTIMULADA.**

La cavidad oral está compuesta por multitud de superficies cubiertas por gran variedad de microorganismos, formando biofilms. Algunos de estos microorganismos, entre ellos las bacterias, están implicados en enfermedades orales como la caries o la enfermedad periodontal, las cuáles son una de las infecciones más comunes en el ser humano (Aas, 2008).

Diversos estudios han revelado que varias localizaciones en la cavidad oral, como las superficies dentales, las mucosas y espacios periodontales, poseen comunidades microbianas únicas. El sistema ecológico oral está dramáticamente influido por fluctuaciones químicas y físicas debido a la ingesta de comida o a las medidas de higiene oral. Sin embargo, varios estudios han demostrado una comunidad microbiana relativamente estable en la cavidad oral, comparado con las de la piel o el tracto gastrointestinal (Aas, 2008; Zaura, 2009).

Es por ello que el medio elegido para nuestro estudio fue la saliva, la cual está bañando todas las superficies de la cavidad oral y podría ser representativa del estado de salud oral de los pacientes. La recogida de saliva como muestra a analizar es un medio accesible y poco agresivo, flexible y útil para realizar un cribado o screening clínico para distinguir los huéspedes con caries activas y monitorizar las medidas preventivas llevadas a cabo para controlar la enfermedad (Yang, 2011).

Otros estudios también han elegido la saliva como medio de análisis, como el realizado por Crielaard en 2011, el cuál tomó saliva no estimulada recogiéndola mediante babeo sin utilizar puntas de papel como hemos hecho nosotros. En dicho estudio, se tomaron muestras de 74 niños de 3 a 18 años, mientras que nosotros las tomamos de niños de 12 años exclusivamente, para valorar la relación microbiana salival con el estado de salud oral y nivel de caries dental. En su estudio, se valoraba el cambio de la microbiota oral según la edad del paciente y el estado de la dentición, pero era de carácter transversal. Al igual que nuestro estudio, la clase bacteriana más abundante fueron los *Firmicutes* o *Bacilli*, seguidos de *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*; lo mismo ocurre con el género, siendo el más prevalente *Streptococcus*, coincidiendo con

nuestros resultados. Las regiones estudiadas del gen del rRNA 16S mediante pirosecuenciación fueron V5-V6. Sin embargo, nuestro estudio, las regiones analizadas fueron V1, V2, y en ocasiones, V3 en función de la conservación de las secuencias. Existen pocos estudios que analicen la saliva de niños mediante pirosecuenciación, siendo este uno de ellos pero con objetivos y metodología distintos al nuestro.

El estudio del gen del rRNA del 16S mediante pirosecuenciación proporciona una detección sensible y discriminación para una amplia filogenia, que permite cuantificar la abundancia relativa de los componentes bacterianos y la variación estructural de las comunidades. Sin embargo, las nueve regiones hipervariables (V1-V9) muestran una variedad de secuencias considerable y diversa entre las diferentes bacterias, la exactitud y fiabilidad de estas aproximaciones está aún siendo probada y mejorada por una selección cautelosa de la región secuenciada.

Otros estudios similares al realizado por nosotros son el estudio transversal de Ling y cols, 2010. Se tomaron muestras de saliva no estimulada mediante el método de “spitting” en 60 niños de 3 a 6 años, para estimar la diversidad bacteriana en cavidad oral de niños con y sin caries mediante PCR-DGGE y 454 pirosecuenciación de la región V3 del gen rRNA del 16S. El criterio seguido para diagnóstico de caries fue el de la Organización Mundial de la Salud (OMS), mientras que nosotros utilizamos el criterio ICDAS II que incluye las lesiones iniciales de caries. Al igual que nuestro estudio, la mayoría de secuencias pertenecían a *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Spiroquetas* y *TM7*. Por lo que respecta al género, mediante la técnica de PCR-DGGE y secuenciación de región V3 con una media de secuencia de 145 bp, encontraron *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Thiomonas*, *Veillonella*, *Atopobium*, *Rothia*, *Actinomyces*, y *Lautropia* constituyendo la microbiota predominante en saliva y placa dental; de entre estos géneros, se encuentran algunos potencialmente cariogénicos como *Streptococcus*, *Actinomyces* y *Veillonella*, los cuáles aparecen en grandes proporciones en la microbiota oral. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, aunque mediante la técnica de pirosecuenciación de las regiones V1-V3 realizada por nosotros, con una longitud media de secuencia de 430-490bp, fueron detectados varios géneros en escasas proporciones que pueden ser resultado del cambio de condiciones en la cavidad oral que lleven a la enfermedad o favorezcan el estado de salud. Ling y cols (2010) concluyen que la microbiota salival no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los niños sanos y con caries; así como que la microbiota en saliva, constituida

predominantemente por géneros como *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Veillonella* y *Rothia*, contribuye a la formación de la placa dental pero no participa directamente en el proceso de formación de la caries dental. En nuestro estudio se observa un aumento del género *Streptococcus* en los grupos de pacientes con lesiones iniciales de la enfermedad, mientras que estos disminuyen cuando hay lesiones cavitadas; los géneros *Actinobacillus*, *Capnocytophaga* y *Neisseria* también disminuyen en los pacientes con lesiones iniciales mientras que *Veillonella*, *Prevotella* y *Granullicatella* aumenta en lesiones iniciales. *Porphyromonas* aumenta en presencia de cavidades de caries y *Aggregatibacter*, *Haemophylus*, *Actinomyces* y *Abiotrophia* disminuyen.

Otro estudio realizado mediante pirosecuenciación fue el llevado a cabo por Yang en 2011, pero el grupo de pacientes estudiados era entre 18 y 22 años y comparaba 19 individuos con caries y 26 sanos, siguiendo el criterio según los criterios OMS. La muestra tomada fue de 2 ml de saliva sin especificar el método de recogida utilizado (estimulada, no estimulada, con chicle de parafina, spitting, babeo, pipeteado, puntas de papel,...) y se observó que la saliva de pacientes sanos, sin caries, presenta patrones más uniformes en la distribución de las especies bacterianas. Por lo tanto, existe una microbiota estable en condiciones de salud que al alterarse el equilibrio, cambia en función del individuo (Hipótesis ecológica de la placa). En nuestro estudio obtenemos resultados similares en cuanto a que la diversidad bacteriana, la cuál disminuye a medida que empeora la enfermedad. Así, los pacientes sanos poseen mayor diversidad bacteriana (mayor número de OTUs y secuencias) que aquellos con lesiones iniciales de caries, y más aún, que los que tienen cavidades de caries. En el estudio de Yang, el número de OTUs que comparten sanos y enfermos es del 0,53% y 0,08%, respectivamente, coincidiendo con nuestros resultados. En este estudio destaca la sobrepoblación de *Prevotella* en pacientes con caries sobre los pacientes sanos, como género asociado a caries, y en nuestro estudio también se observa un aumento de dicho género en los pacientes con lesiones iniciales y cavitadas, aunque en menor proporción, respecto a los sanos.

Yang y cols (2011) secuenciaron todo el metagenoma de 2 muestras (una de un paciente sano y otra de un paciente con caries), analizando las regiones V5-V6 del gen rRNA del 16S insertándolas en *Escherichia coli*, posterior clonación, amplificación y secuenciación. Esta técnica es la anterior a la pirosecuenciación, en la que se obtienen

2000-48000 secuencias, de las cuáles alrededor de 5000 son útiles para clasificarlas a nivel taxonómico. En nuestro estudio secuenciamos 120 muestras de seis subgrupos con diferentes estadios de caries analizando las regiones V1-V2 y V3 si la calidad era adecuada mediante pirosecuenciación. Por lo tanto, la pirosecuenciación es un método una metodología rápida, económica, automatizada y depurada para conocer de manera más sensible la variedad microbiológica de la cavidad oral. Permite un enfoque de alto rendimiento y alta profundidad en el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA y explorar la diversidad en los diferentes microhábitats, por lo que puede ser usado en la detección de poblaciones minoritarias en la microflora oral.

El análisis de secuencias de nuestro estudio fue realizado utilizando la Ribosomal Database Project Classifier, la cuál detecta las secuencias en formato FASTA y proporciona datos a nivel taxonómico de clase y género, al igual que Yang y cols 2011 y Crielaard 2011. Con esta base de datos, obtuvimos 14 clases, hasta 50 géneros, y entre 1350 y 2250 OTUs distintos en saliva no estimulada; mientras que con amplificación y secuenciación obtienen 8 clases y 147 géneros (Crielaard, 2011) y 1450 OTUs (Yang, 2011).

Nuestros resultados sugieren la posibilidad de utilizar la microbiota salival como marcador diagnóstico o barómetro de estado cariogénico, para así desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas en pacientes con riesgo de caries o que ya presentan la enfermedad, aunque hay que tener en consideración las diferencias que hemos encontrado en la comparativa de saliva estimulada que presentamos a continuación,

### **5.3.- ESTUDIO MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN DE SALIVA ESTIMULADA-NO ESTIMULADA.**

Los componentes salivales pueden jugar un rol en la susceptibilidad y desmineralización del esmalte, así como la remineralización y resistencia a la caries dental (Okada, 2002). La caries dental se produce secundariamente al alterarse el equilibrio ecológico de los biofilms microbianos orales. Es comprensible que los cambios en la composición salival produzcan de forma paralela alteraciones de la microflora oral en el desarrollo de la caries, y viceversa (Okada, 2005). En estudios epidemiológicos previos, se ha tomado saliva no estimulada de forma habitual como muestra representativa media de todo el ecosistema de la cavidad oral (Parisotto, 2010;

Jigjid, 2009). Sin embargo, no se han realizado estudios comparativos con otros tipos de muestras salivales como saliva estimulada con chicles de parafina.

En este estudio hemos observado profundas diferencias entre muestras de saliva no estimulada y estimulada de los mismos individuos. Ello indica que el tipo de muestra a utilizar en estudios epidemiológicos puede ser crucial para obtener correlaciones significativas entre estados de salud. Por ejemplo, la diversidad bacteriana en muestras de saliva estimulada es casi el triple respecto a la saliva no estimulada. La posible explicación de este fenómeno puede ser la remoción de los biofilms bacterianos adheridos a las distintas superficies de la cavidad oral (placa bacteriana supragingival, surco gingival y placa bacteriana subgingival, mucosas, paladar duro y blanco, encía queratinizada...) debido a la fuerza masticatoria ejercida durante la masticación del chicle de parafina utilizado para la obtención de las muestras de saliva estimulada.

En un estudio realizado en muestras de saliva no estimulada de 74 niños (3 a 18 años) todas ellas dieron positivo para los cebadores dirigidos a los siguientes filotipos: Actinobacteria (género *Actinomyces* y *Rothia*), Bacteroidetes (género *Prevotella* y orden *Bacteroidales*), Firmicutes o Bacilli (género *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Granulicatella*) y Fusobacteria (género *Fusobacterium*) (Crielaard, 2011). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, en el que dichos géneros bacterianos son comunes en ambos tipos de muestras recogidas (saliva estimulada y no estimulada), pero con proporciones distintas, lo cual puede influir sobre las conclusiones extraídas en este tipo de estudios.

En la formación de la placa dental, los primeros colonizadores son predominantemente *Streptococcus*, y en menor proporción, *Neisseria*, *Actinomyces* y *Haemophilus*.

Una vez estos han ocupado las primeras capas de placa dental, *Fusobacterium* y *Veillonella* aumentan, con el consecuente descenso de *Neisseria* y *Streptococci* (Wilson, 2005). Esto explicaría la relación inversa entre la proporción de *Streptococcus* y *Fusobacterium*-*Porphyromonas* tanto en saliva no estimulada como estimulada observada en nuestro estudio. Tampoco hay que descartar un posible efecto antagonista como el que ha sido descrito entre *Streptococci* y *Fusobacterium*, debido a la sensibilidad de estos últimos al peróxido de hidrógeno (He, 2012).

A nivel subgingival se produce un aumento de géneros anaerobios estrictos, respecto a placa supragingival, como *Fusobacterium*, *Prevotella*, y *Treponema*, y una menor abundancia relativa de *Dialister*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, y *Parvimonas*. En cambio, los grupos que incrementan sus niveles significativamente en la placa supragingival son predominantemente géneros anaerobios facultativos, incluyendo *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Corynebacterium*, y *Kingella*. Esto sugiere que en estas superficies dentales, donde la interacción directa de las bacterias con las células del huésped se ve disminuida, la disponibilidad de oxígeno - un factor ambiental - puede ser un importante motor de composición de la comunidad microbiana (Hata, 2006). Es interesante que en las muestras de saliva no estimulada de este estudio hay una ausencia casi absoluta de los géneros típicamente subgingivales, los cuáles sí aparecen (aunque en proporciones limitadas) en las muestras de saliva estimulada. Por lo tanto, estudios que traten de relacionar la microbiota salival con diferentes estados de salud periodontal basados en saliva no estimulada, carecerían de poder diagnóstico.

La placa bacteriana de superficies lisas, fisuras e interproximal es predominantemente *Streptococci* y *Actinomyces*, siendo ésta más del 50% de la flora cultivable. Los géneros *Veillonella*, *Neisseria* y *Lactobacilli* también aparecen en estas localizaciones, aunque en menor proporción (Wilson, 2005).

En el último estudio realizado por el Human Microbiome Project (HMP) Consortium (Human Microbiome Project Consortium, 2012), se estableció que la saliva tenía la tasa más elevada de diversidad de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) pero aunque la saliva a nivel individual es ecológicamente rica y diversa, la mayoría de miembros de la población compartían organismos similares. Sin embargo, como hemos visto en nuestro estudio, el tipo de muestra salival condicionaría la diversidad bacteriana, y las muestras de saliva del HMP eran de los dos tipos, dependiendo del paciente, mostrando de nuevo una falta de rigurosidad y homogeneidad en la toma de muestras en estudios de microbiología oral.

Por lo que respecta a la abundancia de especies en los distintos nichos orales (estudio metagenómico), *Streptococcus mitis* representa un 80% en mucosa bucal, un 10% en dorso de lengua y un 20% en placa bacteriana supragingival (Wilson, 2005). En el

estudio del 16Ss del Human Microbiome Project Consortium, en cuanto a la distribución por género, en saliva, *Streptococcus* representa un 30% seguido de *Prevotella* (30 %), *Veillonella* (20%), y *Haemophilus* (20%). En mucosa bucal y paladar duro, el género *Streptococcus* ocupa un 50% del total, mientras que la proporción de dicho género es menor en la encía queratinizada, saliva-dorso de lengua, placa bacteriana supragingival y en placa bacteriana subgingival, que es la de menor proporción (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Estos datos podrían explicar la sobrerrepresentación de Bacilli o Firmicutes (genero *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Granulicatella*) en saliva no estimulada. También es posible que este aumento se deba a un incremento de *Streptococcus* y colonizadores tempranos de la placa en las muestras tomadas pocas horas tras el cepillado. En cualquiera de los dos escenarios, las proporciones de bacterias encontradas en muestras de saliva no se corresponden con las de placa supra- y sub-gingival. Este podría ser el motivo de la falta de correlaciones que tan frecuentemente se han observado entre la microbiota oral y distintas enfermedades orales cuando se han utilizado muestras de saliva.

Según el mismo estudio metagenómico del HMP, La placa bacteriana supragingival y placa bacteriana subgingival poseen la misma cantidad de *Lactobacillus* (10%), *Propionibacterium* (20%), *Bacteroides* (10%) y *Staphylococcus* (10%). En placa bacteriana subgingival hay un 20% de *Streptococcus*, 25% de *Corynebacterium*, 30% de *Prevotella*, *Haemophylus* y *Veillonella* en un 20%. En placa bacteriana supragingival, se observaría un 25% de *Streptococcus*, 20% de *Corynebacterium*, 15% de *Prevotella*, 18% de *Haemophylus* y 15% de *Veillonella* (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Estos géneros bacterianos fueron detectados en ambos tipos de muestras tomadas en nuestro estudio, tanto en saliva estimulada como no estimulada. La saliva estimulada ofrece una mayor variabilidad y riqueza microbiológica (Figura 41), ya que el efecto masticatorio puede provocar la liberación y desprendimiento de la placa bacteriana supragingival y subgingival. Géneros bacterianos como *Peptostreptococcus*, *Solobacterium*, *Selenomonas* y *Eubacterium* han sido detectados en placa bacteriana subgingival y no en supragingival, y en dorso de lengua, excepto *Selenomonas* cuya localización es específica en la placa bacteriana subgingival.

Tras los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos recomendar la no utilización de saliva no estimulada como muestra representativa de la microflora de la cavidad oral,

ya que la diversidad bacteriana observada en este fluido oral es casi tres veces menor que con la saliva estimulada. Dado que ambos tipos de saliva no se correlacionan bien con el biofilm bacteriano, sería recomendable tomar muestras del tejido (esmalte, dentina, cemento) o fluido (placa bacteriana supragingival, placa bacteriana subgingival, fluido crevicular) en cuestión directamente asociado a la enfermedad para conocer con exactitud ante qué biofilm nos enfrentamos y cuál es su composición.



## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos tras el estudio de las muestras salivales de niños de 12 años del estudio epidemiológico de escolares de la Comunidad Valenciana 2010 mediante pirosecuenciación de productos de PCR del gen 16S rRNA:

- La composición de la microflora oral en la saliva de niños de 12 años está formada predominantemente por Bacilli, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteria y Actinobacteria a nivel de clase; y a nivel de género por *Actinobacillus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* y *Gemella*.
- El análisis metagenómico de la microflora oral a partir de muestras salivales mediante pirosecuenciación de productos de PCR del gen 16S rRNA permite explorar la diversidad en los diferentes microhábitats, por lo que puede ser usado en la detección de poblaciones minoritarias en la microflora oral.
- Al analizar la relación existente entre los microorganismos orales y la caries dental se observan cambios en la composición microbiana de la saliva en función del estadio de la lesión de caries. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos estudiados en las siguientes clases bacterianas: Bacilli, Gammaproteobacteria, Flavobacteria, Actinobacteria, Sphingomonas, Clostridia y Deltaproteobacteria; y a nivel de género en *Streptococcus* y *Actinobacillus*, *Leptotrichia*, *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Gemella*, *TM7\_genera\_incertae\_sedis*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Pseudomonas* y *Soona*.
- Existen diferencias estadísticamente significativas en la composición de la microbiota oral entre dos métodos de recogida salival (estimulada y no estimulada) de los pacientes estudiados y la biodiversidad bacteriana de la saliva no estimulada es casi tres veces menor que con la saliva estimulada. Por lo que la recogida de saliva estimulada debería recomendarse de forma taxativa en la realización de futuros estudios.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008 Apr;46(4):1407-17.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-32.
- Almerich JM, Zurriaga O, Martinez MA, Sullana A, Llena MC, Ortolà JC et al. Estudio de salud bucodental en la Comunidad Valenciana. Informe de salud nº 47. Valencia: Dirección General de Salud Pública. Generalitat Valenciana; 1999.
- Almerich Silla JM. Fundamentos y concepto actual de la actuación preventiva y terapéutica del flúor. En: Cuenca E, Baca P. *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.* 3ª ed. Barcelona: Masson; 2005. p.105-30.
- Almerich-Silla JM, Montiel-Company, JM. Oral health survey of the child population in the Valencia Region of Spain (2004). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E369-81.
- Alonso J, Pérez P, Sáez M, Murillo C. Validez de la ocupación como indicador de la clase según la clasificación del British Registrar General. *Gac Sanit* 1997; 11:205-13.
- Argimón S, Caufield PW. Distribution of putative virulence genes in *Streptococcus mutans* strains does not correlate with caries experience. *J Clin Microbiol.* 2011 Mar;49(3):984-92.
- Baca García P. Caries: fundamentos actuales de su prevención y control. En: Cuenca E, Baca P. *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.* 3ª ed. Barcelona: Masson; 2005. p.19-40.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial

species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002 Mar;40(3):1001-9.

- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, Mira A. The oral metagenome in health and disease. *The ISME J* 2011 Jun; 30 doi: 10.1038/ismej.2011.85
- Bravo M et al. Encuesta de salud oral en España 2005. *RCOE* 2006; 4(11): 409-56.
- Bravo M, Cortés J, Casals E, Llena C, Almerich-Silla JM, Cuenca E. Basic oral health goals for Spain 2015-2020. *Int Dent J.* 2009;59(2):78-82.
- Bravo-Pérez M, Casals-Peidró E, Cortés-Martinicorena FJ, LLodra-Calvo JC. Encuesta de Salud Oral en España 2005. *RCOE* 2006; 11(4): 409-56.
- Cheon K, Moser SA, Whiddon J, Osgood RC, Momeni S, Ruby JD, Cutter GR, Allison DB, Childers NK. Genetic diversity of plaque mutans streptococci with rep-PCR. *J Dent Res* 2011 Mar;90(3):331-5.
- Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* 2009; 19(2):141-7
- Cortelli SC, Cortelli JR, Aquino DR, Holzhausen M, Franco GC, Costa Fde O, Fine D. Clinical status and detection of periodontopathogens and *Streptococcus mutans* in children with high levels of supragingival biofilm. *Braz Oral Res* 2009; 23(3):313-8
- Cortés Martinicorena FJ, Doria Bajo A, Asenjo Madoz MA, Sainz de Murieta Iriarte I, Ramón Torrel JM, Cuenca Sala E. Prevalencia de caries y estado periodontal de los niños y adolescentes de Navarra (2002) *RCOE* 2003; 8(4):381-90.
- Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Medical Genomics* 2011 Mar 4;4:22
- Domingo Salvany A, Marcos Alonso J. Propuesta de un indicador de la clase social basado en la ocupación. *Gac Sanit* 1989; 10: 320-326.

- Franco e Franco TCC, Amoroso P, Marin JM, de Ávila FA. Detection of Streptococcus mutans and Streptococcus Sobrinus in Dental Plaque Samples from Brazilian Preschool Children by Polymerase Chain Reaction. Braz Dent J 2007; 18(4): 329-33.
- Ge Y, Caufield PW, Fisch GS, Li Y. Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis Colonization Correlated with Caries Experience in Children. Caries Res 2008; 42: 444-8.
- Gimeno de Sande A, Sanchez B, Viñes J, Gómez F, Mariño F. Estudio epidemiológico de la caries dental y patología bucal en España. Rev Sanid Hig Pública (Madr). 1971 Apr;45(4):361-433.
- Gómez Santos G. III Estudio Epidemiológico de la Salud Bucodental Infantil en Canarias 2006. Dirección General de Salud Pública del Servicio Canario de la Salud. Consejería de Sanidad y Consumo 2008. Disponible en: [www.gobiernodecanarias.org](http://www.gobiernodecanarias.org)
- Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, Asnani K, Griffen AL. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. J Clin Microbiol 2010 Nov;48(11):4121-8.
- Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología y de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. Una propuesta de medida de la clase social. Aten Primaria 2000; 25:350-363.
- Hart TC, Corby PM, Hauskrecht M, Hee Ryu O, Pelikan R, Valko M, Oliveira MB, Hoehn GT, Bretz WA. Identification of microbial and proteomic biomarkers in early childhood caries. Int J Dent. 2011;2011:196721. Epub 2011 Oct 16.
- Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H. Quantitative detection on Streptococcus mutans in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. Lett Appl Microbiol 2006; 42:127-31.
- Iwano Y, Sugano N, Matsumoto K, Nishihara R, Iizuka T, Yoshinuma N, Ito K. Salivary microbial levels in relation to periodontal status and caries development. J Periodont Res 2010;45(2):165-9.

- Jiang W, Jiang Y, Li C, Liang J. Investigation of supragingival plaque microbiota in different caries status of Chinese preschool children by denaturing gradient gel electrophoresis. *Microb Ecol.* 2011 Feb;61(2):342-52.
- Jigjid B, Ueno M, Shinada K, Kawaguchi Y. Early childhood caries and related risk factors in Mongolian children. *Community Dent Health* 2009; 26(2):121-8.
- Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R Jr, Moore A, Hughes CV, Pradhan N, Loo CY, Tanner AC. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res* 2010;44(5):485-97.
- Kanasi E, Johansson I, Lu SC, Kressin NR, Nunn ME, Kent R, Tanner ACR. Microbial Risk Markers for Childhood Caries in Pediatricians' Offices. *J Dent Res* 2010; 89(4):378-83.
- Keijser BJJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W. Pyrosequencing Analysis of the Oral Microflora of Healthy Adults. *J Dent Res* 2008; 87(11):1016-20.
- Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, Osterås M, Schrenzel J, François P. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* 2009;79(3):266-71.
- Lembo FL, Longo PL, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues CRMD, Mayer MPA. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 313-9.
- Ling Z, Kong J, Jia P, Wei C, Wang Y, Pan Z, Huang W, Li L, Chen H, Xiang C. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. *Microb Ecol* 2010 Oct;60(3):677-90.
- Llodra JC, Bravo M, Cortés J. Encuesta de salud oral en España (2000). *RCOE* 2002; 7 N° Esp.:19-63.
- Loyola-Rodriguez JP, Martínez-Martínez RE, Flores-Ferreira BI, Patiño-Marin N, Alpuche-Solís AG, Reyes-Macias JF. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Mexican preschool caries-free

and caries-active children by microbial and molecular (PCR) assays. *J Clin Pediatr Dent* 2008; 32(2):121-6.

- Michael Wilson, *Microbial Inhabitants of Humans*. Cambridge University Press, 2005, chapter 8.
- Moser SA, Mitchell SC, Ruby JD, Momeni S, Osgood RC, Whiddon J, Childers NK. Repetitive extragenic palindromic PCR for study of *Streptococcus mutans* diversity and transmission in human populations. *J Clin Microbiol*. 2010 Feb;48(2):599-602.
- Noguerol B, Llodra JC, Sicilia A, Follana M. *La salud bucodental en España 1994. Antecedentes y perspectivas de futuro*. Madrid: Ediciones Avances, 1995.
- Nurelhuda NM, Al-Haroni M, Trovik TA, Bakken V. Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries Res* 2010; 44(4): 402-7.
- Nurelhuda NM, Al-Haroni M, Trovik TA, Bakken V. Caries experience and quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries Res* 2010;44(4):402-7.
- Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. Longitudinal study of dental caries incidente associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J Med Microbiol* 2005; 54:661-5.
- Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *J Med Microbiol* 2002; 51:443-7.
- Organización Mundial de la Salud. *Encuestas de salud bucodental: métodos básicos*. 4ª Ed. Ginebra: OMS; 1997.
- Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and *mutans streptococci*: a systematic review. *Oral Health Prev Dent* 2010; 8 (1): 59-70.

- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3770-83.
- Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, Levy SM, Banas JA. Streptococcus mutans strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol* 2011 Jun;26(3):187-99.
- Pieralisi FJS, Rodrigues MR, Segura VG, Maciel SM, Ferreira FBA, Garcia JE, Poli-Frederico RC. Genotypic diversity of streptococcus mutans in caries free and caries active preschool children. *Int J Dent* 2010;1-5.
- Preza D, Olsen I, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Diversity and site-specificity of the oral microflora in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Sep;28(9):1033-40. Epub 2009 Apr 17.
- Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, Chen Z, Katz RV, Jean-Charles G, Li Y. PCR detection of Streptococcus mutans and Aggregatibacter actinomycetemcomitans in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Invest* 2011;15(4):461-9.
- Rioboo R. Dieta y nutrición. En: Rioboo R. Higiene y Prevención en Odontología. Individual y Comunitaria. Avances Médico- Dentales 1994. P.361-85.
- Rioboo R. Factores de riesgo de la caries y la enfermedad periodontal. En: Rioboo R. Higiene y Prevención en Odontología. Individual y Comunitaria. Avances Médico- Dentales 1994. P.277-306.
- Rodis OM, Matsumura S, Kariya N, Okazaki Y, Ogata S, Reissmann DR. Culture-based PCR analysis of plaque samples of Japanese school children to assess the presence of six common cariogenic bacteria and its association with caries risk. *Mol Cell Probes* 2009;23(6):259-63.
- Rubio Colavida JM, Robledo de Dios T, LLodra Calvo JC, Simón Salazar F, Artazcoz Osés J, González Andrés V, García-Camba de la Muela JM. Criterios mínimos de los estudios epidemiológicos de salud dental en escolares. *Rev Esp Salud Pública* 1997; 71; 231-42.

- Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012 Jun 14;13(6):R42.
- Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effecto of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:47-52.
- Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T, Bird PS. Oral Streptococcus species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 2009; 19(6):406-11.
- Serra Majem, Ll. Dieta, nutrición y Salud Oral. En: Cuenca E, Baca P. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. 3ª ed. Barcelona: Masson; 2005. p.63-86.
- Servicio de Epidemiología. Estudio de salud bucodental en escolares de municipios seleccionados. Serie informes de salud, nº18. Valencia: Dirección General de Salud Pública. Generalitat Valenciana; 1995.
- Shahabouee M, Rismanchian M, Yaghini J, Babashahi A, Badrian H, Goroohi H. Microflora around teeth and dental implants. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Mar;9(2):215-20.
- Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci* 2007;115(4):308-14
- Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica K, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(2): 111-7.
- Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Human Microbiome Project Consortium. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234.
- Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol* 2004 Aug;42(8):3827-30.
- Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-Time

TaqMan PCR for Quantifying Oral Bacteria during Biofilm Formation. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3827–30.

- Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R Jr, Van Dyke T, Sonis ST. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res*. 2006 Apr;85(4):318-23.
- The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed Chromatogr*. 2005 Apr;19(3):214-22.
- Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer J. Are mutans streptococci detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res* 2006; 40(5):366-74.
- Van Loveren C, Duggal MS. Experts' Opinions on the Role of Diet in Caries Prevention. *Caries Res* 2004; 38(suppl 1): 16-23.
- Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JR, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM.
- Wolff D, Staehle HJ, Wolff B. Amplification of minute amounts of oral bacterial DNA for real-time quantitative PCR analysis. *Caries Res* 2010;44(5):498-504.
- Xie G, Chain PS, Lo CC, Liu KL, Gans J, Merritt J, Qi F. Community and gene composition of a human dental plaque microbiota obtained by metagenomic sequencing. *Mol Oral Microbiol* 2010 Dec;25(6):391-405
- Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol* 2003 Sep;41(9):4438-41.
- Yoshida, A., N. Suzuki, Y. Nakano, M. Kawada, T. Oho, and T. Koga. 2003. Development of a 5 nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol* 41:4438–4441.
- Zongxin L, Jianming K, Peng J. Análisis of Oral Microbiota in Children with Dental Caries by PCR-DGGE and Barcoded Pyrosequencing. *Microb Ecol* DOI 10.1007/s00248-010-9712-8.

## **8. ANEXOS**



**ANEXO 1.**  
**EQUIPOS DE EXPLORACIÓN**



El trabajo de campo ha sido realizado por seis licenciados en Odontología contratados por la Universitat de València como becarios de colaboración. Las personas seleccionadas fueron:

- José Enrique Iranzo Cortés
- Regina Parra Gadea
- Ángel del Campo Rodríguez
- Maria Isabel Rodríguez Gómez
- Marta Pérez Rodenas
- Jorge Sanz Gallur



**ANEXO 2.**  
**MODELOS DE CARTAS INFORMATIVAS**  
**UTILIZADAS**





## FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Universitat de València

Unidad Docente de Odontología Preventiva y Comunitaria

Dentro de las actividades de la Unidad de Odontología Preventiva y Comunitaria, del Departamento de Estomatología, estamos desarrollando estudios de vigilancia epidemiológica sobre la salud oral de los escolares de la Comunidad Valenciana.

Por ello solicitamos su consentimiento para realizar una exploración buco-dental y una encuesta sobre hábitos relacionados con la salud oral.

Nombre y apellidos del alumno/a:

Firma del padre/madre o tutor/a:

Fecha:





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Valencia, Septiembre 2010

Estimado Sr. Director/a:

La Unidad Docente de Odontología Preventiva y Comunitaria del departamento de Estomatología de la Universidad de València ha promovido la realización de un estudio epidemiológico sobre la salud bucodental de los escolares valencianos, con el propósito de hacer un seguimiento de los indicadores de salud dental de esta población que actualmente se encuentra siguiendo el programa de salud bucodental.

El centro que Vd. dirige ha sido seleccionado para dicho estudio, que consistirá en un examen bucodental básico de los niños de 9 a 14 años. La revisión la llevarán a cabo especialistas cualificados, bajo la supervisión de la Unidad de Odontología Preventiva y Comunitaria de la Facultad de Medicina y Odontología. En fechas próximas nos pondremos en contacto con Vd. para explicarle detalladamente todos los pormenores del trabajo de campo.

Atentamente,

José Manuel Almerich Silla

Director del Departamento de Estomatología





FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
Universitat de València  
Unidad de Odontología Preventiva y Comunitaria

CARTA INFORMATIVA A LOS PADRES

El/La alumno/a:.....  
una vez realizada la exploración buco-dental autorizada por usted/es y llevada a cabo por los equipos de odontólogos del proyecto “ENCUESTA DE SALUD ORAL DE LOS ESCOLARES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA-2010” presenta:

- SANO
- CARIES DENTAL
- NECESIDAD DE ELIMINACIÓN DEL SARRO
- NECESIDAD DE ORTODONCIA
- REFUERZO EN LA HIGIENE ORAL
- OTRAS:.....

Se recomienda la visita al odontólogo para la valoración de la necesidad de tratamiento de las patologías observadas en dicho alumno con la mayor brevedad posible.

Fecha:



**ANEXO 3.**  
**MODELO DE FICHA DE EXPLORACIÓN**  
**UTILIZADA**



# Encuesta de salud oral

## Comunidad Valenciana, 2010

Fecha de la exploración	Examinador	Lote	Nº de identificación	Original/Duplicado	Nacionalidad
d d m m a a					
Peso(Kg)	Altura (cm)	Flúor colegio 0=No 1= Si	Flúor (Años)	Fecha Nacimiento	Muestras Saliva 0=No 1= Si
				Mes      Año	Años de residencia
Nombre: _____			Sexo		
			1 = Hombre 2 = Mujer		
Ocupación padres:		Padre	Madre		PAIS

CARIES													
	Diente	M	O	D	V	L		Diente	M	O	D	V	L
17							37						
16							36						
15							35						
14							34						
13							33						
12							32						
11							31						
21							41						
22							42						
23							43						
24							44						
25							45						
26							46						
27							47						

**ICDAS II**

<p><b>1er Dígito: Código de restauración</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>0 = Sin sellado ni restauración</li> <li>1 = Sellado parcial</li> <li>2 = Sellado total</li> <li>3 = Obturación estética</li> <li>4 = Obturación de amalgama</li> <li>5 = Corona de acero</li> <li>6 = Corona metal-porcelana, jacket, veneer</li> <li>7 = Obturación rota o perdida</li> <li>8 = Obturación provisional</li> </ul>	<p><b>2º Dígito: Código de caries</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>0 = Sano</li> <li>1 = Mínimo cambio visual en esmalte tras secar</li> <li>2 = Cambio visual en esmalte con diente húmedo</li> <li>3 = Fractura de esmalte (sin dentina expuesta)</li> <li>4 = Sombra en dentina (sin dentina expuesta)</li> <li>5 = Cavidad con dentina expuesta</li> <li>6 = Cavidad extensa (más de 1/2 de la superficie)</li> </ul> <p><b>Dientes ausentes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>96 = No valorable</li> <li>97 = Ausente por caries</li> <li>98 = Ausente por otra causa</li> <li>99 = No erupcionado</li> </ul>
---	---

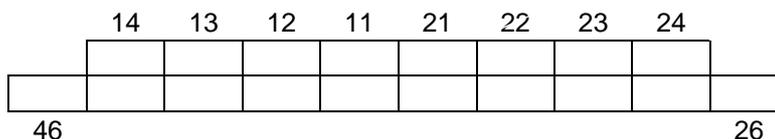
## ÍNDICE PERIODONTAL COMUNITARIO

- 0= Sano
- 1= Hemorragia
- 2= Cálculo/Obt. Desbordante

16	11	26
46	31	36

## HIPOPLASIA

- 0= Sano
- 1= Opacidad delimitada
- 2= Opacidad difusa
- 3= Hipoplasia
- 4= Otros defectos
- 5= Opacidad delimitada y difusa
- 6= Opacidad delimitada e hipoplasia
- 7= Opacidad difusa e hipoplasia
- 8= Las tres alteraciones
- 9= No registrado



## FLUOROSIS

Dientes permanentes

- 0= Normal
- 1= Discutible
- 2= Muy ligera
- 3= Ligera
- 4= Moderada
- 5= Intensa
- 6= Excluida
- 7= No registrada

## MATERIALES DE OBTURACIÓN

Nº de dientes con obturación de AMALGAMA

Nº de dientes con obturación de COMPOSITE

## NECESIDAD INMEDIATA DE ASISTENCIA Y CONSULTA

Trastorno que amenaza la vida  
Dolor o infección  
Otro trastorno


0= Ausente
1= Presente
9= No registrado

Especificar.....

## UTILIZACIÓN DE SERVICIOS

¿Ha visitado alguna vez la consulta del dentista?

- 0= No
- 1= Sí, público.
- 2= Sí, privado.
- 3= Sí, ambos.

**ANEXO 4.**  
**EJEMPLOS ICDAS II**



**Ejemplos:**

**Código 0: Sano**

*Fosas y fisuras*



*Superficies lisas (M y D)*



*Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*



## Código 1: Cambio visual inicial en esmalte

### *Fosas y fisuras*



Diente húmedo



Diente seco

### *Superficies lisas (M y D)*

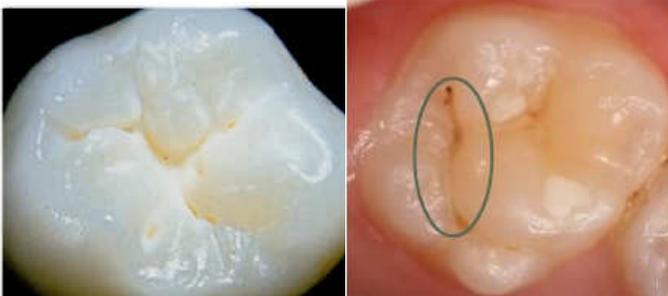


### *Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*



**Código 2: Cambio distintivo visual en esmalte sin secar**

*Fosas y fisuras*



*Superficies lisas (M y D)*



*Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*



### Código 3: Esmalte fracturado de forma localizada

#### *Fosas y fisuras*



#### *Superficies lisas (M y D)*

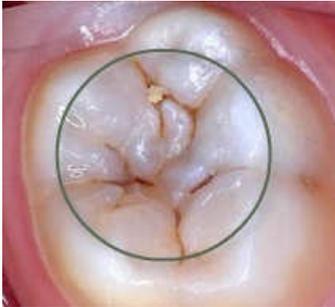


#### *Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*



**Código 4: Sombra oscura de la dentina por debajo del esmalte**

*Fosas y fisuras*



*Superficies lisas (M y D)*



Approximal surface example wet



Approximal surface example dry

*Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*



Free smooth surface

**Código 5: Cavidad distintiva con esmalte visible**

*Fosas y fisuras*



*Superficies lisas (M y D)*



*Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*

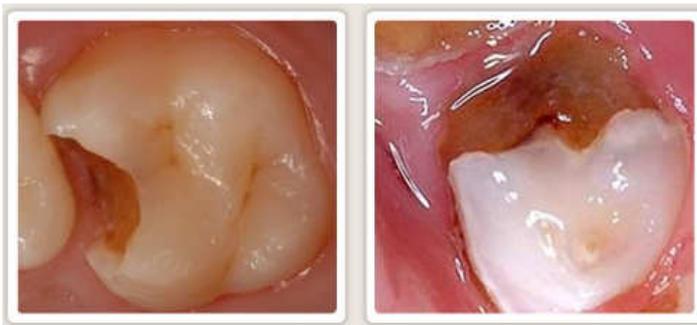


**Código 6: Cavidad extensa con dentina visible**

*Fosas y fisuras*



*Superficies lisas (M y D)*



*Superficies lisas libres (V y Pt/L; M y D si no hay diente adyacente)*



**Ejemplos ICDAS II (Dos dígitos):**

**Código 0: Sano, sin obturación ni sellado.**



**Código 4: Amalgama**



**Código 1: Sellado parcial.**



**Código 5: Corona acero inoxidable**



**Código 2: Sellado total.**



**Código 6: Veneer o corona de oro, ceramometálica o de porcelana.**



**Código 3: Restauración estética**



**Código 7: Restauración rota o perdida.**



**Código 8: Obturación provisional**



---