Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología

Análisis del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) mediante la técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Jhovany Ernesto SEGURA ROJAS

ASESOR

Dr. Roger Damasco CALLA POMA

COASESOR

Dra. María Gisella ORJEDA FERNÁNDEZ

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Segura J. Análisis del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) mediante la técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jhovany Ernesto Segura Rojas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75440172
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0000-0220-6588
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Roger Damaso Calla Poma
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41198397
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5128-212X
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	María Gisella Orjeda Fernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10839204
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3013-5523
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Donald Ramos Perfecto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10712181
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Margarita Fé Requena Mendizábal
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06595374
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Roger Damaso Calla Poma
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	41198397
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.3.2.1. Estudio de la biología y microbiología de la cavidad bucal
Grupo de investigación	Biotecnología Estomatológica-BIOEST
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos Interdisciplinarios para el Fomento de la Cooperación Interinstitucional en Investigación e Innovación – Política Nacional de Educación Superior Técnico Productiva (PNESTP-MINEDU). RR N° 009412-2021-R/UNMSM, Código: B2110006i
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Clínica Dental Capodent País: Perú Departamento: Lima Provincia: Callao Distrito: Callao Calle: Av. Alejandro Bertello Bollati 1703 Latitud: -11.990872 Longitud: -77.110895 Edificio: Laboratorio de Genómica y Bioinformática para la Biodiversidad, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Av. Carlos Germán Amezaga 375 Latitud: -12.058333 Longitud: -77.083333
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021- 2023
URL de disciplinas OCDE	Odontología, Cirugía oral, Medicina Oral: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.14 Biotecnología relacionada con la salud: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE ODONTOLOGIA *VICE DECANATO ACADÉMICO*
UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE
(AYOE)
"Año de la unidad, la Paz y el desarrollo"

A C T A DE SUSTENTACIÓN
PRESENCIAL N°043

Los Docentes que suscriben, reunidos el 22 de diciembre del 2023 en la ciudad de Lima, siendo las 10:00 horas, por encargo del Señor Decano de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista del Bachiller.

SEGURA ROJAS, JHOVANY ERNESTO

CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis **«ANÁLISIS DEL MICROBIOMA ORAL EN PACIENTES SANOS USUARIOS DE CLORURO DE CETILPIRIDINIO (CPC) MEDIANTE LA TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN *METABARCODING* DEL GEN ARNr 16S»** y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demostró un grado de aprovechamiento: ...sobresaliente.....

siendo calificado con un promedio de: diecinueve (escala) 19

(en letras) (en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los veintidos días del mes de diciembre del dos mil veintitrés.

PRESIDENTE DEL JURADO

Dr. Donald Ramos Perfecto

MIEMBRO SECRETARIO

Mg. Margarita Fé Requena Mendizábal

MIEMBRO VOCAL (ASESOR)

Dr. Roger Damasco Calla Poma

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS * VICEDECANATO ACADEMICO * UNAYOE * FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)
Criterios: Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Roger Damaso Calla Poma en mi condición de asesor acreditado con Oficio N° OFICIO VIRTUAL N°0376/FO-VDAC-UNAYOE/2022 de la tesis, cuyo título es **"Análisis del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) mediante la técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S"**; presentado por el egresado Jhovany Ernesto SEGURA ROJAS, para optar el título profesional de Cirujano Dentista.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y deSimilitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual (RR 002616-2023-R).

Según la revisión análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 4% de similitud, nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado académico correspondiente.



Firma del Asesor

DNI: 41198397

Nombres y apellidos del asesor: Roger Damaso Calla Poma



Huella digital

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr 16S	Gen de ARN ribosomal 16S
CPC	Cloruro de cetilpiridinio
PCR	Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa
ONT	Oxford Nanopore Technologies / Tecnología Nanoporos de Oxford
NGS	Next Generation Sequencing / Secuenciación de Próxima Generación
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
OTU	Operational Taxonomic Units / Unidad Taxonómica Operacional
SUP	Super-accurate algorithm / Algoritmo Super Preciso
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
kb	Mil pares de bases
mL	Mililitro
µL	Microlitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
x g	Tiempos de gravedad

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón la presente tesis a mi familia, cuyo amor y apoyo incondicional han sido mi mayor fuente de fortaleza y motivación a lo largo de mi vida académica. A mis amados padres, Ernesto Segura Cáceres y Noriz Rojas Quintanilla, por su constante aliento y sacrificios, quienes incondicionalmente dieron todo de sí para ver formar a su hijo profesionalmente. A mis hermanos, Jhoselyn y Daniel, por su cariño y comprensión cuando más los necesitaba. Sabemos que no ha sido nada fácil, pero peldaño a peldaño se alcanzan los objetivos trazados.

¡Este logro es de todos nosotros familia!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar gracias a Dios por darme la vida, guiarme por el buen camino, fortalecerme día tras día, sin dejarme caer en el intento y permitirme compartir este logro con las personas que más aprecio.

A mis queridos padres, Ernesto Segura Cáceres y Noriz Rojas Quintanilla, por brindarme siempre su apoyo incondicional, por su amor, por ser mi soporte y constante motivación, y por enseñarme a nunca rendirme ante las adversidades y que sin ellos no sería nada.

A mi asesor, Dr. Roger Calla cuyos valiosos ejemplos y consejos me mostraron el camino hacia la perseverancia y excelencia académica. Así mismo, expresar mi profunda gratitud al Dr. Pablo Millones, por su orientación experta, apoyo inquebrantable y paciencia a lo largo de todo este proceso, cuya pasión y dedicación han sido fundamentales en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Gisella Orjeda y el Dr. Jorge Ramírez, mi más profundo agradecimiento, quienes me brindaron la oportunidad de ser parte del proyecto financiado: “Aplicaciones ómicas en sistemas biológicos para usos específicos en biodiversidad, salud y ambiente” a través del Programa de Proyectos Interdisciplinarios para el fomento de la Cooperación Interinstitucional en Investigación e Innovación - Política Nacional de Educación Superior Técnico Productiva (PNESTP-MINEDU).

A los Blgos. Renato La Torre y Esteban Caycho por guiarme con sus conocimientos, por su apoyo generoso y constante desde el primer día dentro y fuera del laboratorio, permitiéndome comprender el interesante mundo de la biología molecular.

Al Blgo. Leandro Alama, por su colaboración en la investigación y por bridarme el soporte para el procesamiento y análisis bioinformático a través de herramientas de *metabarcoding* desarrolladas en el Laboratorio Genómica y Bioinformática para la Biodiversidad, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

Al Dr. Donal Ramos y la Dra. Margarita Requena, por su valioso apoyo y orientación en la revisión de este trabajo de investigación.

A todos mis amigos, docentes y familiares que merecen un agradecimiento especial, por sus enseñanzas, lecciones de vida a lo largo de mi etapa universitaria, su apoyo en los momentos difíciles, recordándome constantemente la importancia de la educación y de encaminarme por el buen sendero.

A todos ustedes, les estoy profundamente agradecido. ¡Muchas Gracias!

RESUMEN

Objetivo: Analizar los taxones bacterianos del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) empleando la técnica molecular de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S. **Metodología:** Se recolectaron muestras de saliva de 12 pacientes sanos en dos momentos diferentes, antes y una semana después de haber utilizado CPC. Se realizó la extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación del gen ARNr 16S mediante nanoporos y finalmente el análisis bioinformático para identificar la diversidad y cantidad de especies bacterianas presente en las muestras. **Resultados:** Se evidenció que el CPC modificó distintos taxones bacterianos, en concreto, aumentó significativamente la abundancia de Proteobacterias (*Haemophilus parainfluenzae*), una bacteria que puede colonizar el intestino y producir complicaciones como la enfermedad de Crohn. Así mismo, se redujo principalmente la cantidad de Firmicutes (*Veillonella*, *Streptococcus*), Bacteroidetes (*Prevotella*), Proteobacterias (*Neisseria*), estas últimas bacterias son reductoras de nitratos beneficiosas para la regulación del pH salival, presión arterial y resistencia a la insulina. **Conclusiones:** El uso a corto plazo del CPC alteró la diversidad y composición del microbioma oral sano, sin embargo, estos hallazgos requieren una mayor investigación para determinar si el enjuague bucal de CPC es perjudicial o no para las bacterias orales en un contexto de la salud oral y sistémica.

Palabras clave: microbioma oral, metagenómica, *metabarcoding*, gen ARNr 16S, enjuague bucal.

ABSTRACT

Objective: To analyze the bacterial taxa of the oral microbiome in healthy patients using cetylpyridinium chloride (CPC) using the molecular technique of metabarcoding sequencing of the 16S rRNA gene. **Methodology:** Saliva samples were collected from 12 healthy patients at two different times, before and one week after using CPC. DNA extraction, library preparation, 16S rRNA gene sequencing using nanopores and finally bioinformatic analysis were performed to identify the diversity and quantity of bacterial species present in the samples. **Results:** It was evidenced that CPC modified different bacterial taxa, specifically, it significantly increased the abundance of Proteobacteria (*Haemophilus parainfluenzae*), a bacterium that can colonize the intestine and produce complications such as Crohn's disease. Likewise, the amount of Firmicutes (*Veillonella*, *Streptococcus*), Bacteroidetes (*Prevotella*), Proteobacteria (*Neisseria*), the latter bacteria are nitrate reducing bacteria beneficial for the regulation of salivary pH, blood pressure and insulin resistance, was mainly reduced. **Conclusions:** Short-term use of CPC altered the diversity and composition of the healthy oral microbiome, however, these findings require further investigation to determine whether or not CPC mouthwash is detrimental to oral bacteria in an oral and systemic health context.

Key words: oral microbiome, metagenomics, metabarcoding, 16S rRNA gene, mouthwash.

ÍNDICE

Pág.

I. INTRODUCCIÓN 9
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 10
2.1 Área problema 10
2.2 Delimitación del problema 11
2.3 Formulación del problema 11
2.4 Objetivos 12
2.4.1 Objetivo general 12
2.4.2 Objetivos específicos 12
2.5 Justificación 12
2.6 Limitaciones 13
III. MARCO TEÓRICO 14
3.1 Antecedentes 14
3.2 Bases teóricas 17
3.3 Definición de términos 31
3.4 Hipótesis 32
3.5 Operacionalización de variables 32
IV. METODOLOGÍA 33
4.1 Tipo de investigación 33
4.2 Población y muestra 33
4.3 Técnicas y procedimientos 34
4.4 Procesamiento de datos 37
4.5 Análisis de resultados 38
V. RESULTADOS 40
VI. DISCUSIÓN 54
VII. CONCLUSIONES 58
VIII. RECOMENDACIONES 59
IX. BIBLIOGRAFÍA 60
X. ANEXOS 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura química del Cloruro de Cetilpiridinio (CPC)……...**29**

Figura 2. Electroforesis de ADN producto de la PCR de las 12 muestras antes (superior) y 12 muestras después (inferior)……**42**

Figura 3. Número de lecturas por muestra en la secuenciación por nanoporos……..**42**

Figura 4. Índices de diversidad alfa, Chao1 (abundancia), Shannon (diversidad) y Simpson (equitatividad) en conjunto de todas las muestras antes y una semana después del uso del CPC. ***: $p \leq 0.05$……...**44**

Figura 5. Gráfico 2. Índice de diversidad beta, Escalado Multidimensional o PCoA en todos los muestreos respecto a las muestras antes y una semana después del uso del CPC……..……**45**

Figura 6. Diagrama de barras apiladas que muestran los taxones y sus abundancias relativas. A. Composición de los phylum más abundantes en las diferentes muestras agrupadas y comparadas para cada paciente, denominadas A1-D1 hasta A12-D12. B. Abundancia relativa del microbioma oral según Phylum, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de CPC……**47**

Figura 7. Diagrama de barras apiladas que muestran los taxones y sus abundancias relativas. A. Composición de los géneros más abundantes en las diferentes muestras agrupadas y comparadas para cada paciente, denominadas A1-D1 hasta A12-D12. B. Abundancia relativa del microbioma oral según Género, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de CPC……**50**

Figura 8. Diagrama de barras apiladas que muestran los taxones y sus abundancias relativas. A. Composición de las especies más abundantes en las diferentes muestras agrupadas y comparadas para cada paciente, denominadas A1-D1 hasta A12-D12. B. Abundancia relativa del microbioma oral según Especie, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de CPC……**53**

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Codificación de las 24 muestras (12 antes y 12 después)……**40**

Tabla 2. Barcode (código para la preparación de librerías), código, concentración y calidad del ADN extraído de las muestras en NanoDrop™……**41**

Tabla 3. Abundancia relativa del microbioma oral según Phylum, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC)……**46**

Tabla 4. Abundancia relativa del microbioma oral según Género, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC)……**48**

Tabla 5. Abundancia relativa del microbioma oral según Especie, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC)……**51**

ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Protocolo de uso del enjuague bucal de Cloruro de Cetilpiridinio (CPC) de la Clínica Odontológica Privada……..**69**

Anexo 2. Ficha de Recolección de Datos…….**70**

Anexo 3. Consentimiento Informado para la participación de los pacientes en la investigación……..**71**

Anexo 4. Procesamiento de las muestras…….**73**

Anexo 5. Preparación de la librería molecular (metabarcoding)……**75**

Anexo 6. Secuenciamiento con la plataforma de Nanoporos……**77**

Anexo 7. Resultados de las lecturas de OTUs posterior a la comparación y alineamiento por BLAST……..**78**

Anexo 8. Tablas de Clasificación Taxonómicas……..**79**

I. INTRODUCCIÓN

El microbioma oral alberga comunidades de microrganismos bacterianos que conforman una parte elemental del volumen total de nuestro cuerpo y están en continuo equilibro protegiendo el sistema integral del ser humano.[11] Esta condición de balance microbiano, puede verse afectada por diversas alteraciones en el ambiente bucal, conocidas como disbiosis, lo cual favorece a un desequilibrio en la población microbiana habitual, permitiendo la proliferación de microrganismos patógenos dando lugar a diversas enfermedades tanto orales como sistémicas.[13, 14]

Ahora bien, estos últimos años el uso de enjuagatorios bucales ha tenido mayor relevancia, y este interés se ha acentuado aún más con la aparición de la pandemia del virus SARS-CoV-2 (COVID-19). Muchos de los profesionales odontólogos han recurrido al uso de estos colutorios con la finalidad de salvaguardar o de buscar una mayor prevención, disminuyendo la carga viral y así evitar posibles contagios, incluso varios pacientes han buscado con el mismo propósito, estas medidas protectoras y preventivas para combatir este virus.

Sin embargo, el uso excesivo de enjuagues bucales puede resultar perjudicial para la salud oral y sistémica de un individuo. No cabe duda que los enjuagues bucales pueden eliminar un gran porcentaje de los microorganismos responsables de enfermedades orales, pero hay que advertir a los usuarios de que pueden afectar negativamente a la estabilidad de las bacterias beneficiosas que residen en la cavidad bucal. Por ejemplo, al igual que con el consumo de antibióticos de venta libre, los enjuagues bucales eliminan las bacterias benéficas o probióticas del individuo.[17, 21]

A todo esto, actualmente gracias al constante avance de la ciencia, han surgido nuevas tecnologías en este nuevo campo de la microbiología que es la metagenómica, basados en técnicas de secuenciamiento molecular, específicamente en el análisis del gen ARNr 16S, constituido como un código de barras *(metabarcoding)* exclusivo para bacterias, con el fin de poder estudiar gran parte del ecosistema de microorganismos, lo que actualmente sería imposible estudiar con técnicas convencionales de cultivos microbianos.[28, 35] Por lo tanto, en todo este contexto, poder analizar el microbioma oral de los pacientes que utilizan enjuagatorio bucal de cloruro de cetilpiridinio (CPC), ha motivado a la realización de esta tesis, cuya importancia consiste en identificar la diversidad y cantidad bacteriana presente en el microbioma oral y sus posibles cambios, buscando observar de manera inicial si el uso de estos enjuagues altera o no el equilibrio bacteriano, todo ello mediante el apoyo de técnicas biológicas-moleculares.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Área problema

A nivel mundial, el Proyecto Microbioma Humano (HMP) destaca como una de las iniciativas más prominentes en el campo de la metagenómica. Este proyecto, iniciado en el 2008 por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, marca un destacado avance en la trayectoria de la investigación médica científica. Se basa en el uso de avanzadas técnicas de Secuenciación de Próxima Generación (NGS) para el estudio del microbioma humano, con el propósito de identificar, caracterizar y confirmar los cambios producidos por los diversos microorganismos asociados a los seres humanos, tanto sanos como enfermos.[1]

En el 2012 la Revista Nature presentó los resultados acerca del microbioma en el cuerpo humano destacando que había 10 veces más bacterias por cada célula humana.[2] Entonces esa diferencia demostraba la gran cantidad de bacterias en el organismo ya sea en zonas como la boca, piel, genito-urinario, desde el tracto gastrointestinal hasta el recto, etc. y que son parte esencial de la microbiota natural del cuerpo humano.

Por lo tanto, a partir del año 2012 se considera al microbioma como un sistema de microrganismos que integran el cuerpo humano, ayudando a mantenernos en equilibrio y salud, por lo contrario, cuando se rompe el equilibrio (disbiosis) es cuando puede llegar a producir múltiples enfermedades como por ejemplo autoinmunes (Artritis reumatoide, Síndrome de Sjögren, Esclerosis Sistémica)[3], distintos tipos de cáncer[4], crónicas (obesidad, diabetes)[5] o incluso afecciones psiquiátricas (Alzheimer).[6]

Sin embargo, estos nuevos conocimientos sobre el microbioma, han hecho pensar en muchas ocasiones, ¿Qué ocurre cuando los odontólogos recomiendan un antiséptico bucal, con la finalidad de prevenir? Aparentemente, lo único que se estaría ocasionando es alterar el equilibrio, y no solamente a nivel bucal sino también en el sistema integral del cuerpo.

Durante la pandemia originada por el SARS-CoV-2 (COVID-19), los Cirujanos Dentistas han manifestado temores a ser contagiados, buscando usar distintos productos como enjuagatorios bucales como el CPC con la finalidad de prevenir o disminuir el nivel de infección viral. Sin embargo, dicho uso, ha demostrado su eficacia en diferentes estudios *in vitro*[7, 8] faltando muchos trabajos clínicos que respalden su uso en la atención de pacientes.

Al margen de la posible efectividad del CPC sobre el COVID-19, está pendiente conocer el impacto que tiene el uso preventivo de estos enjuagues sobre el ecosistema

microbiológico. Por tanto, esta investigación pretende determinar mediante el análisis metagenómico el impacto que genera el uso de enjuagues bucales con CPC en el microbioma oral en pacientes clínicamente sanos.

2.2 Delimitación del problema

Si bien es cierto, conocemos la existencia de los diversos tipos clásicos de cultivos bacterianos, la metagenómica representa un área de investigación reciente que se dedica a la extracción, secuenciación y análisis de los genomas presentes en una comunidad microbiana. Esta metodología posibilita estudiar una amplia variedad de genes y los productos que generan.[9]

En este estudio, aplicaremos la técnica de secuenciación *metabarcoding*, utilizando la tecnología de tercera generación de Oxford Nanopore Technologies (ONT). Esta tecnología, basada en la biología molecular, nos permite identificar y diferenciar microorganismos. El estándar de oro para la identificación es la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S), la cual proporciona información valiosa para el avance de la clasificación de los microoganismos bacterianos en la era moderna.[10]

Hasta ahora, se han identificado alrededor de 700 especies bacterianas en la cavidad oral, lo que equivale al 25% del microbioma humano.[11] De estas, seis filos bacterianos principales (Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes y Spirochaetes) constituyen el 96% del total de bacterias orales. Estos microorganismos interactúan para mantener un equilibrio en un ecosistema donde cada comunidad aporta de alguna manera, desempeñando un papel esencial en la salud bucal y sistémica.[12]

En consecuencia, es importante conocer e identificar la diversidad y la cantidad de microorganismos que pueden estar alterados en el microbioma oral humano, es decir, que taxones bacterianos podrían variar cuando se lleva a cabo un uso descontrolado del enjuague bucal de CPC en pacientes clínicamente sanos, comprendiéndose a individuos sin enfermedades orales y sistémicas subyacentes.

2.3 Formulación del problema

Por lo expuesto anteriormente surge la siguiente interrogante:

¿Cuáles son los taxones bacterianos presentes en el microbioma oral de los pacientes sanos usuarios de enjuague bucal de cloruro de cetilpiridinio (CPC)?

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

- ✓ Analizar los taxones bacterianos del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) empleando la técnica molecular de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S.

2.4.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar la diversidad de especies bacterianas del microbioma oral en pacientes sanos usuarios del enjuague bucal de CPC.
- ✓ Identificar la cantidad de especies bacterianas del microbioma oral en pacientes sanos usuarios del enjuague bucal de CPC.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos de diversidad y cantidad de especies bacterianas del microbioma oral, antes y una semana después del uso del enjuague bucal de CPC.

2.5 Justificación

El equilibrio en el microbioma oral es mantenido en gran parte gracias a la comunidad diversa de microorganismos que cohabitan, incluyendo aquellos que son beneficiosos, los que tienen relaciones de simbiosis, y los que pueden causar enfermedades. Con el tiempo, hemos descubierto que la presencia de estos microorganismos en un estado de disbiosis, es decir, en un desequilibrio, tiene la capacidad de colonizar diversos órganos en el cuerpo humano y provocar diversas alteraciones.[13, 14, 15]

En este estudio actual, se busca emplear métodos moleculares avanzados, como la metagenómica, en particular la técnica de *metabarcoding*, a través de las últimas técnicas de secuenciación de genomas, utilizando tecnologías de tercera generación, como la de nanoporos, la cual nos garantiza una compresión detallada en el estudio de entornos microbianos complejos.

Es importante destacar que los colutorios representan un aliado fundamental en la práctica odontológica, ya que promueven la mejora de la higiene bucal, reduciendo, por ejemplo, la formación de biofilm dental, caries y la gingivitis, entre otras afecciones. Sin embargo, en la actualidad, su uso se ha extendido de manera descontrolada con la premisa de prevenir problemas, lo que podría desequilibrar las bacterias comensales que desempeñan funciones beneficiosas. Por lo tanto, esta investigación tiene como prioridad resaltar la importancia de realizar un análisis exhaustivo del microbioma oral

humano, ya que esto es fundamental para comprender su rol en la salud y la enfermedad en general.

Así mismo, a través de esta investigación, se pretende contribuir a resolver el problema de considerar que todos los microorganismos son perjudiciales y deben ser erradicados. Este estudio proporcionará información significativa que permitirá un uso más preciso y una valoración más adecuada de los enjuagues bucales con CPC en pacientes clínicamente sanos, aportando al mejoramiento en los procedimientos de atención.

2.6 Limitaciones

- Una de las principales limitaciones en este estudio radica en la necesidad de llevar a cabo procedimientos muy costosos, ya que se requirió emplear una variedad de recursos, que incluyeron personal altamente capacitado, materiales específicos y equipos de laboratorio especializados.
- A pesar de los esfuerzos por garantizar la representatividad de la muestra, se desarrolló una población relativamente pequeña, esto podría aumentar la susceptibilidad a sesgos.
- Así mismo, la toma de muestras en el contexto de la pandemia por COVID-19.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes

Liu T. *et al.* (2023), realizaron un estudio cuyo propósito fue determinar los efectos a corto plazo de los enjuagues bucales de clorhexidina (CHX) y Listerine® (LIS) colutorio que contiene aceites esenciales, sobre el microbioma oral de pacientes hospitalizados. Se reclutaron 87 paciente distribuidos en tres grupos: CHX, LIS y solución salina (control). Se tomaron muestras de saliva antes y después de usar los enjuagues dos veces al día durante 7 días, y se analizaron las bacterias orales mediante secuenciación del gen ARNr 16S. Los resultados evidenciaron una disminución significativa en la diversidad alfa a nivel de género en los grupos CHX y LIS, pero no hubo una diferencia clara entre ellos. Se reveló ocho géneros bacterianos entre ellos *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* y *Selenomonas* con una abundancia relativa menor, mientras que *Rothia* aumentó después del uso de CHX. En el caso de LIS, siete géneros incluidos *Parvimonas*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Tannerella*, mostraron una disminución en su abundancia relativa, aunque en menor medida que en el grupo CHX. En comparación con CHX, se observó un menor número de bacterias reductoras de nitratos importantes para la salud vascular y la resistencia a la insulina. Se concluyó que, el uso a corto plazo de CHX y LIS alteraron la microbiota oral de los pacientes hospitalizados, sin embargo afectaron a diferentes géneros bacterianos y con magnitudes de cambio menores en el caso de LIS.[16]

Brookes Z. *et al.* (2021), realizaron una revisión sistemática cuyo objetivo fue examinar cómo el enjuague bucal de clorhexidina (CHX) afecta la composición del ecosistema microbiano en la cavidad oral, tanto en situaciones de salud como de enfermedad, a través de un estudio *in vivo*. Se aplicó la jerarquía de la evidencia, consultando las revisiones sistemáticas, los ensayos controlados aleatorios cuando estaban disponibles y los estudios de casos y controles se describieron posteriormente. Los términos de búsqueda para cada categoría temática se ingresaron en PubMed, Google Scholar, MEDLINE y Cochrane. Se obtuvo como resultado una evidencia limitada, pero varios estudios de Secuenciación de Próxima Generación sugirieron que la CHX puede disminuir la diversidad y abundancia de bacterias, especialmente las reductoras de nitratos. También se observaron cambios en el pH salival, lactato, nitrato y nitrito en la saliva. No obstante, la comprensión de los efectos de la CHX en el microbioma oral durante la enfermedad bucodental aún está en una etapa inicial. En conclusión, la CHX modificó la composición del microbioma oral, pero aún se necesita investigaciones adicionales a través de estudios de metagenómica en comunidades microbianas, para

comprender su impacto en la salud bucodental y sistémica, dado que la CHX sigue siendo ampliamente utilizada en odontología para el tratamiento de enfermedades orales.[17]

Verma D. *et al.* (2021), realizaron una investigación cuyo propósito fue identificar el microbioma oral de la subpoblación sana del norte de la India. Se seleccionaron a 20 personas (12 hombres y 8 mujeres). Durante este estudio, se exploraron muestras derivados del mismo enjuague con solución salina, para identificar la diversidad bacteriana utilizando la región hipervariable V3 del ARNr 16S con la plataforma MiSeq Illumina. Se obtuvieron como resultados de las unidades taxonómicas operativas (OTUs), 20 filos con la dominancia de Firmicutes (28,87%) y Proteobacteria (25,17%), Bacteroidetes (16,69%), Actinobacteria (4,14%), Fusobacteria (2,17%), Espiroquetas (0,45%) y 162 géneros con mayor dominancia *Streptococcus* (16,52%), *Neisseria* (13,11%), *Prevotella* (9,38%), *Haemophilus* (8,19%), *Rothia* (2,32%), *Porphyromonas* (2,47%), *Granulicatella* (1,89%), *Veillonella* (1,94%), *Actinomyces* (1,27%), *Fusobacterium* (1,14%), y *Actinobacillus* (1,21%). Los estudios de correlación indican que *Streptococcus* comparte una fuerte relación con *Rothia, Corynebacterium, Prevotella y Veillonella*, mientras que se correlacionó negativamente con *Neisseria, Aggregatibacter, Porphyromonas y Fusobacterium* como bacterias Gram negativas. La diversidad bacteriana mostró diferencias insignificantes a nivel de edad y género. Se concluye que este estudio ampliará aún más nuestra comprensión de la limitada información disponible sobre el microbioma oral saludable de la población india.[18]

Bescos R. *et al.* (2020), realizaron un estudio de diseño simple ciego, cruzado y no aleatorizado cuyo objetivo fue examinar los efectos del uso de enjuague bucal de clorhexidina (CHX) durante 7 días en el microbioma oral y su impacto en varios biomarcadores de saliva y plasma en 36 individuos sanos (25 mujeres y 11 varones). Se realizaron enjuagues bucales, de un minuto, dos veces al día, durante siete días con un enjuague bucal placebo, y posteriormente se repitió el mismo procedimiento utilizando CHX. Se tomaron muestras de saliva que se congelaron a -80° en un tubo estéril antes de la secuenciación metagenómica del ARNr 16S del microbioma oral y muestras de sangre al final de cada tratamiento para analizar la abundancia y diversidad de bacterias orales y las concentraciones de pH, lactato, glucosa, nitrato y nitrito. Se obtuvo como resultado que la CHX aumentó significativamente la abundancia de Firmicutes y Proteobacteria, y redujo el contenido de Bacteroidetes, TM7, SR1 y Fusobacteria. Esta modificación se relacionó con una marcada reducción en la acidez de la saliva y en su capacidad para resistir cambios en el pH, a la vez que se observó

un incremento en los niveles de glucosa y lactato en la saliva. Además, se registraron concentraciones menores de nitrito tanto en la saliva como en la sangre después de usar CHX, lo que coincidió con una tendencia al alza en la presión arterial sistólica. En conclusión, este estudio demostró que el enjuague bucal que contiene CHX está asociado con un cambio importante en el microbioma oral, lo que genera condiciones más ácidas y una menor disponibilidad de nitritos en individuos sanos.[19]

Omori M. *et al.* (2020), realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar los efectos de los diferentes tiempos y métodos de recolección de muestras orales en los resultados del análisis del microbioma oral. Se recolectaron muestras orales de ocho individuos sanos (4 hombres y 4 mujeres) en cuatro momentos diferentes: 2 h después de comer, inmediatamente después de cepillarse los dientes, inmediatamente después de despertarse y 2 h después de comer del día siguiente, y se evaluaron cuatro métodos de recolección de saliva: no estimulada, estimulada, hisopos de algodón y enjuague bucal. Se compararon los microbiomas orales de estas muestras mediante el análisis metagenómico de los datos de la secuencia del gen ARNr 16S bacteriano. Se obtuvo como resultado que la composición del microbioma oral a nivel de género fue similar en todos los tiempos de recolección y métodos de muestras. La diversidad alfa no fue significativamente diferente entre los grupos, mientras que la diversidad beta fue diferente entre los métodos de saliva no estimulada y de hisopo de algodón. Se concluyó que, aunque los perfiles del microbioma oral obtenidos en diferentes tiempos de recolección y utilizando diferentes métodos resultaron ser similares, pero se detectaron algunas diferencias, además sugieren que cada protocolo utilizado en el presente estudio es adecuado para diferentes propósitos y en entornos clínicos de estudios relacionados con el microbioma oral humano.[20]

Asworth A. *et al.* (2019), realizaron un estudio donde se investigó los efectos del enjuague bucal antibacteriano sobre la capacidad reductora de nitrato oral y el pH salival, glucosa y lactato, así como las concentraciones de nitrato y nitrito salival y plasmático. Se realizó un estudio simple ciego no aleatorio para estimar los efectos del enjuague bucal de clorhexidina (CHX) en 41 participantes sanos no fumadores (27 mujeres y 14 hombres). Los participantes recibieron un enjuague bucal placebo durante siete días y un enjuague bucal de clorhexidina (CHX) durante otros siete días. Se obtuvieron muestras de sangre y saliva. Se usó SPSS para examinar los datos usando la prueba t de Student y se aceptó la significancia en $p<0.05$. Los resultados mostraron que el enjuague bucal antibacteriano redujo significativamente la capacidad oral de reducción de nitratos y el pH salival. Las concentraciones de glucosa y lactato salival

aumentaron significativamente. Las concentraciones de nitrito en plasma y saliva disminuyeron significativamente. En conclusión, el enjuague bucal antibacteriano afectó significativamente la capacidad del microbioma oral para reducir el nitrato a nitrito y este cambio en el microbioma se reflejó en la reducción del pH salival y el aumento de las concentraciones salivales de glucosa y lactato.[21]

May M. *et al.* (2018), realizaron una investigación cuyo propósito fue evaluar si el microbioma oral puede alterar el microbioma esofágico y modificar potencialmente el riesgo y la evolución de enfermedades esofágicas. Se realizó un ensayo controlado aleatorio con 20 pacientes (12 mujeres y 8 hombres), programados para endoscopia superior por razones médicas, donde se aplicó enjuague bucal de clorhexidina (CHX) dos veces al día durante las dos semanas previas a la endoscopia, mientras que otro grupo no recibió ningún tratamiento. Se tomaron muestras de hisopos orales y saliva al inicio del estudio y durante la endoscopia se obtuvieron cepillados de cardias escamosos y gástricos esofágicos. La secuenciación del gen ARNr 16S reveló que, al inicio, Firmicutes era el filo predominante en los hisopos orales, y los géneros predominantes eran *Streptococcus* y *Haemophilus*. El uso de CHX mostró una tendencia a reducir la diversidad bacteriana en comparación con el grupo que no recibió tratamiento, con un aumento de *Neisseria subflava* y una disminución de *Streptococcus* y *Haemophilus.* Además, se observó una correlación significativa entre la abundancia de *Streptococcus* en la boca y en el cardias esofágico (rho=0,92, p=0,001). Se concluyó que el tratamiento con CHX alteró claramente el microbioma oral, y estos cambios estuvieron relacionados con el tracto gastrointestinal superior. Por lo tanto, dirigirse al microbioma oral podría representar un método para alterar el microbioma esofágico, justificando así estudios adicionales en condiciones patológicas del esófago.[22]

3.2 Bases teóricas

3.2.1 Metagenómica

A diferencia de la genómica, que estudia el ADN genómico de una sola especie, organismo o célula, la metagenómica estudia el ADN genómico de toda una comunidad. Desde una perspectiva etimológica, "meta" proviene del griego, significando "más allá", por lo que la metagenómica se podría describir como "más allá de la genómica".[23]

Este nuevo campo científico abarca cualquier investigación que utilice técnicas moleculares para analizar comunidades microbianas en su entorno natural, sin requerir su aislamiento, cultivo u observación. Además, se centra en el estudio de genomas de microorganismos que no son susceptibles de ser cultivados, con el fin de mejorar la

comprensión de la ecología microbiana en diversos hábitats, como los ecosistemas bucales, intestinales y otros.[24]

Según el informe del Instituto Americano de Microbiología (2002) la metagenómica se define como “La secuenciación a gran escala del material genómico agrupado en una comunidad, ya sea con aproximaciones aleatorias o específicas, ensamblado de secuencias de genomas únicos o grupos de genomas, la determinación de la variación en genes de la comunidad y el contenido del genoma en tiempo y espacio, la influencia de las actividades antropogénicas, la función, la diferenciación y la evolución del genoma de la comunidad”.[25]

Es evidente que el enfoque en el campo de la metagenómica se centra en la investigación de las comunidades microbianas, lo que proporciona conocimientos no solo sobre la clasificación de los microorganismos, sino también sobre sus actividades metabólicas y las interacciones entre sus componentes en sus respectivos entornos ecológicos. Sin embargo, se puede sostener que las definiciones de la metagenómica deben seguir siendo amplias y comprensivas.[26]

3.2.2 *Metabarcoding*

Explorar minuciosamente el microbioma de un ecosistema presenta desafíos debido a la dificultad de cultivar numerosos microorganismos en el laboratorio. En consecuencia, poseer un método particular que pueda lograrlo es bastante beneficioso y permite una comprensión exhaustiva de los microorganismos que viven allí. Estos análisis metagenómicos, también conocidos como *metabarcoding*, pueden realizarse a partir de la investigación de uno o más genes, permitiendo así una caracterización detallada de la diversidad microbiana en el entorno estudiado .[27]

Así mismo, resaltar que el flujo de trabajo del *metabarcoding* consta de tres componentes esenciales: campo, laboratorio y bioinformática. La parte de campo consiste en la recolecta de muestras ambientales, por ejemplo, agua, sangre, saliva, entre otros, que se conservan o congelan antes de la extracción de ADN. El componente de laboratorio consta de cuatro pasos básicos: primero, se extrae el ADN y se purifica, segundo, se utiliza la PCR para amplificar un gen o una región específica como por ejemplo el ARNr 16S, tercero, se utilizan cebadores o primers unidos a una etiqueta denominadas "barcoding o códigos de barras", estas se incorporan mediante PCR o se unen además a diferentes productos de PCR, creando una "librería" mediante la cual se pueden agrupar varias muestras, y finalmente, las librerías agrupadas se secuencian inmediatamente en un secuenciador de alto rendimiento. Después de la manipulación

de las muestras, el último paso consiste en procesar computacionalmente los archivos de salida del secuenciador mediante un sólido proceso bioinformático.[28]

De esta manera, el surgimiento del *metabarcoding* se ha visto favorecido por el empleo de las nuevas tecnologías de secuenciación del ADN y la necesidad de caracterizar los organismos a un alto nivel taxonómico. Este concepto se refiere al método de identificación de diferentes especies a partir de muestras ambientales utilizando una región corta de ADN de un tipo específico de microorganismo. El efecto de esto es mejorar la capacidad de identificar y clasificar comunidades microbianas, ya que los enfoques convencionales podrían pasar por alto.[29]

3.2.2.1 Extracción de ADN metagenómico

El primer paso en el desarrollo del análisis metagenómico consiste en aislar el ADN ambiental, y la calidad de la extracción del ADN influye en gran medida la representación de las comunidades presentes en la muestra.[30]

Según el tipo de muestra que se pretenda emplear, en la actualidad se encuentran disponibles diversos kits comerciales que proporcionan ADN de alta calidad, listo para su aplicación en procedimientos posteriores, como la amplificación y secuenciación del ADN.[31]

El kit de aislamiento de ADN PowerSoil® (Qiagen) es uno de los más populares; utiliza la tecnología de eliminación de inhibidores para separar el ADN genómico de las muestras ambientales. Además, los Quick-DNA Plus (Zymo Research), son los kits de aislamiento de ADN más rápidos, sencillos y con un alto rendimiento en la extracción de cultivos celulares, tejidos sólidos, saliva y cualquier muestra de fluido biológico. Por ello, para permitir una amplificación más eficaz mediante PCR y detectar microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y arqueas, el ADN aislado debe tener un alto grado de pureza.[31]

3.2.2.2 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que emplea una enzima para amplificar una secuencia de ADN específica de manera exponencial a través de múltiples ciclos, manteniendo la precisión de la copia. Se fundamenta en el desempeño de la enzima ADN polimerasa, que normalmente sintetiza ADN en las células. Cuando se utiliza ADN genómico como punto de partida, se conoce como PCR convencional.[32]

La PCR se destaca por ser una herramienta avanzada en el estudio de los ácidos nucleicos. Se distingue por sus resultados rápidos y precisos además de contar con un análisis sencillo.[32]

Los elementos esenciales para esta reacción incluyen la plantilla genética, la enzima polimerasa, los primers o cebadores, los dNTPs (nucleótidos), el ion magnesio (Mg+), un buffer, y agua pura. Estos colaboran en las tres etapas fundamentales como son la desnaturalización, alineamiento y extensión. La PCR se lleva a cabo en termocicladores diseñados para mantener condiciones de temperatura y tiempo constantes en cada ciclo del procedimiento.[32]

3.2.2.3 Gen ARNr 16S

La secuenciación del gen ARNr 16S es la técnica "*gold standard*" más popular para la identificación taxonómica de bacterias. Dado que este gen contiene regiones altamente variables y conservadas que permiten la identificación y clasificación taxonómica de organismos a diferentes niveles filogenéticos. Se considera un excelente marcador molecular que puede utilizarse en estudios de código de barras (barcoding) y/o estudios taxonómicos.[33]

Además, con la amplificación por PCR, en la que se secuencian mediante primers específicos destinados a amplificar la región de interés, se comparan con otras secuencias almacenadas en las bases de datos y, en última instancia, se utilizan para caracterizar cepas que aún no han sido identificadas. Actualmente, existen más de tres millones de secuencias de este gen específico en las bases de datos, donde se registran las secuencias examinadas para su identificación.[33]

Por ello, las relaciones filogenéticas y la diversidad de los microorganismos bacterianos se determinan con frecuencia mediante el análisis de secuenciamiento del gen ARNr 16S. Con este método se ha demostrado que los taxones Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Fusobacteria constituyen la mayor parte de la microbiota oral.[34]

3.2.2.4 Metodología Oxford Nanopore Technologies (ONT)

Actualmente, las metodologías de secuenciación de ADN se clasifican en tres generaciones: Las de primera generación denominadas de Sanger, Maxam & Gilbert, las de segunda generación o llamadas también Secuenciación de Próxima Generación (NGS) como Ilumina, Ion Torrent, Solexa y los de tercera generación entre ellos el SMRT

de PacBio, Nanoporos de Oxford Technologies (ONT). En comparación con las tecnologías anteriores, estas últimas utilizan fragmentos de ADN mucho más grandes (>10 Kb). Aunque estos métodos pueden ser rápidos y permitir lecturas de fragmentos largos, al principio tenían una tasa de error elevada (>5%), lo que podía repercutir en el análisis. Sin embargo, estas lecturas largas tienen la ventaja de permitir comparaciones más precisas con otras secuencias almacenadas en las bases de datos.[35]

No obstante, la metodología ONT se distingue de otros métodos debido a que permite secuenciar largas cadenas de ADN. En esta técnica, una hebra de ADN pasa a través de un nanoporo, sobre la cual incide una señal eléctrica única que detecta variaciones en la corriente de iones a medida que un nucleótido atraviesa el poro. Esto permite registrar e identificar cada base en tiempo real.[36]

3.2.2.5 Instrumentos bioinformáticos y estadísticos

Como las plataformas de secuenciación de alto rendimiento producen tantos datos genómicos, es decir, son demasiado grandes para que un ordenador estándar pueda manejarlos. Por este motivo, la bioinformática ha adquirido una importancia fundamental en las metodologías de secuenciación masiva, ya que es necesaria para utilizar y analizar los datos biológicos. Para alinear y ensamblar estas secuencias aisladas, se necesitan herramientas bioinformáticas potentes. Por ende, las secuencias de nucleótidos de los genes de las muestras se comparan con secuencias de nucleótidos de referencia de bases de datos como "SILVA rRNA database Project", "Ribosomal Data Project" y "GenBank", esta última del National Center for Biotechnology (NCBI), con el fin de describir el perfil taxonómico.[37, 38]

Cabe mencionar que el control de calidad, la eliminación de duplicados innecesarios, la eliminación de secuencias quiméricas y, posteriormente, la agrupación de secuencias en base a similitudes y características superpuestas, son los pasos convencionales de un análisis bioinformático.[39]

Por último, se realizan análisis estadísticos y asignaciones taxonómicas para identificar cambios significativos en comparación con la secuencia de referencia. Todo ello requiere un software altamente complejo y en constante evolución. El Ribosomal Database Project, la programación R, EPI2ME, QIIME y GALAXY son algunas de las herramientas bioinformáticas disponibles en la actualidad.[39]

3.2.3 Microbioma oral

Para comprender el papel del microbioma oral, es importante analizar sus características dinámicas y esenciales. La cavidad bucal es un hábitat con más de 700 especies bacterianas que contribuyen a la salud bucal y general del individuo.[40]

La cavidad bucal de los individuos sanos contiene cientos de especies bacterianas y también algunas fúngicas. Muchos de estos microorganismos pueden asociarse para formar biopelículas, que son resistentes al estrés mecánico o al tratamiento antibiótico. La mayoría también son especies comensales, pero pueden volverse patógenas en respuesta a cambios en el ambiente, como la calidad de higiene personal, el tabaquismo, los agentes antimicrobianos, la dieta entre otros factores.[41]

La composición del microbioma oral varía en las diferentes superficies y lugares específicos, cada uno con su propio microambiente, como en mejillas, paladar, lengua, superficie dental, encías y saliva. Así, lo evidencia cómo incluso pequeños cambios en el hábitat pueden afectar a la capacidad de colonización y dominio de especies individuales.[42]

3.2.3.1 Disbiosis

El término disbiosis, también conocido como disbacteriosis, se refiere a un desequilibrio microbiano que resulta de modificaciones en el funcionamiento, la distribución o la composición de la microbiota estable, ya sea cuantitativa o cualitativamente.[43]

La disbiosis se observa en ecosistemas perturbados de forma persistente, en donde se pierde la diversidad junto con el nivel de salud del organismo. La ecología microbiana ha demostrado que la resiliencia de un sistema y su capacidad para enfrentar el estrés ambiental, disminuye a medida que se reduce la diversidad bacteriana.[44]

Por otro lado, la disbiosis es común en el tracto digestivo, pero puede ocurrir en áreas expuestas, como la cavidad bucal, afectando a la asimilación de nutrientes, elaboración de vitaminas, la limitación de patógenos, la modificación en la dieta, al uso de antibióticos, logrando perturbar el equilibrio microbiano y provocando disbiosis. [45]

El genoma del microbioma está en constante interacción con el entorno ecosistémico de su huésped. Por lo tanto, cualquier cambio en la composición o el funcionamiento del entorno, como una disbiosis, repercute directamente en el microbioma y puede provocar diversas enfermedades y alteraciones en la respuesta inmunitaria.[46]

3.2.4 Microbioma oral y enfermedades orales

3.2.4.1 Caries dental

La caries dental es una enfermedad que causa la degradación progresiva del tejido dental. Distintos elementos como la alimentación, la composición de la saliva, la estructura dental, las prácticas de higiene bucal y la actividad de microorganismos específicos influyen en esta enfermedad. Alteraciones en los factores físicos, químicos e inmunológicos pueden desequilibrar la microbiota oral, desencadenando la caries dental.[47]

En la comunidad de microorganismos relacionados con este desbalance microbiano se incluyen *Streptococcus mutans, Scardovia wiggsiae, Lactobacillus sp,* y *Actinomyces spp.*[48]

En el pasado, la caries dental se vinculaba principalmente a *S. mutans*, considerándolo la causa de la enfermedad. Sin embargo, el nuevo enfoque bacteriano-ecológico revela un ecosistema complejo en lesiones cariosas, donde *S. mutans* es solo una fracción. La interacción cooperativa de diversos grupos bacterianos en los tejidos duros dentales se respalda con la evidencia de genomas en estudios recientes de biología molecular.[49]

3.2.4.2 Enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales son enfermedades polimicrobianas orales complejas que causan la destrucción del periodonto como la encía y el hueso alveolar, siendo la gingivitis y la periodontitis las más comunes.[50]

Con el avance de la ciencia, nuestra comprensión de las causas de las enfermedades periodontales ha cambiado. La detección genómica de una variedad de microorganismos en áreas gingivales y las bolsas periodontales ha revelado la mayor complejidad de las comunidades microbianas y conglomerados bacterianos de lo que se consideraba anteriormente.[51]

Los periodontopatógenos conocidos son *Treponemas*, *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, ciertas *Prevotellas* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estudios de biología molecular han identificado nuevos patógenos periodontales, como *Desulfobulbus spp*., *Filifactor alocis spp*. y *TM7 spp*., que se encuentran con alta frecuencia en algunos sujetos con enfermedad periodontal. En ocasiones*, F. alocis* se ha encontrado más frecuentemente que *P. gingivalis* y *Treponema denticola*, mientras que *Desulfobulbus spp*. y *TM7 spp*. se han hallado con

la misma frecuencia que otros patógenos periodontales conocidos. Además, se han hallado Proteobacterias, Clamydias, Flavobacterias, Coriobacterias, Bifidobacteriales y varios tipos del orden Clostridiale, así como Enterobacterias, *Staphylococcus* y otras bacterias menos habituales en afecciones periodontales.[52]

El origen de la enfermedad periodontal es diversa y compleja, y estos nuevos hallazgos aportan una mayor comprensión. Se han identificado varios microorganismos cuyo rol específico en el surgimiento y desarrollo de la enfermedad aún no se comprende completamente, pero su presencia debe ser considerada en futuras investigaciones.[53]

3.2.4.3 Enfermedad de la mucosa oral

La leucoplasia oral (LO), el liquen plano oral (LPO) y el lupus eritematoso sistémico (LES) son afecciones de la mucosa oral común o manifestaciones de enfermedades sistemáticas. La LO es una lesión oral blanca que es principalmente asintomática y no está relacionada con ningún otro proceso patológico.[53] El LPO es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que, en su forma erosiva a largo plazo, conlleva un riesgo de transformarse en cáncer.[54] El LES por su parte, es una enfermedad autoinmune crónica con manifestaciones sistémicas y una patogenia compleja que resulta en la formación de autoanticuerpos.[55]

Recientemente gracias a la metagenómica varios estudios han demostrado el desequilibrio en la microbiota salival y que estas bacterias juegan un papel importante en estas enfermedades de las mucosas, entre ellas como *Haemophilus, Fusobacterias, Firmicutes, Leptotrichia spp.* y *Campylobacter concisus.*[56, 57]

3.2.4.4 Cáncer oral

El cáncer oral, una variante de los cánceres de cabeza y cuello, engloba el crecimiento anormal de tejido en la cavidad oral. Su incidencia está en constante aumento, situándose como la sexta forma más prevalente de cáncer en el mundo en la actualidad.[58]

Más del 90% de todos los cánceres son carcinomas de células escamosas orales (CCEO), la neoplasia maligna más común en la cavidad oral y en las zonas adyacentes.[59]

Recientemente, ha aumentado la evidencia que sugiere el papel de las bacterias en la carcinogénesis, de hecho, se ha afirmado que hábitos como la mala higiene bucal u otros factores potencian un desequilibrio modificando de esta forma el ecosistema oral,

dando lugar al riesgo de cáncer bucal y la propagación a los tejidos adyacentes, si los microbios acceden a la circulación sanguínea o se diseminan localmente.[60]

Mediante la técnica de secuenciación se encontraron las siguientes bacterias: *Fusobacterium sp., Peptostreptococcus sp., Prevotella sp., Capnocytophaga gingivalis, Fusococcus sp. y P. gingivalis*. Estas bacterias, relacionadas con CCEO y lesiones premalignas orales, actúan con otras en el complejo oral para crear disbiosis. Además, estudios han señalado a *P. gingivalis* y *F. nucleatum* como posibles factores asociados a la carcinogénesis al influir en la respuesta inmunitaria proinflamatoria en células epiteliales, desempeñando un papel crucial en el cáncer oral.[61]

3.2.5 Microbioma oral y enfermedades sistémicas

3.2.5.1 Enfermedades del sistema endocrino

Diabetes

Diversas investigaciones han examinado la relación entre el microbioma y determinadas enfermedades endocrinas, como la diabetes mellitus. Se ha notado una distinción importante en la microbiota subgingival de individuos con diabetes tipo 2 en comparación con aquellos que no padecen esta enfermedad. Los resultados de algunos estudios indican una mayor proporción de *Neisseria, Veillonella, Streptococcus, Gemella, Eikenella, Selenomonas, Fusobacterium, Aggregatibacter, Capnocytophaga y TM7*.[52]

También se ha informado del impacto de la diabetes sobre los cambios en el microbioma oral, se evidenció un aumento *en P. gingivalis* y *Tannerella forsythia*.[60] Otro estudio informó un aumento de los niveles de *Capnocytophaga, Pseudomonas, Bergeyella, Sphingomonas, Corynebacterium, Propionibacterium*, y *Neisseria* en individuos hiperglucémicos.[63] Un estudio de secuenciación informó que la diabetes reduce *P. gingivalis, T. forsythia*, y *Treponema denticola*.[64]

3.2.5.2 Enfermedades del sistema cardiovascular

La inflamación sistémica ha establecido una relación entre las enfermedades cardiovasculares y la periodontitis. El microbioma oral desempeña una función clave en el desarrollo de placas ateromatosas, y la aterogénesis está asociada con la cantidad y diversidad de microorganismos orales.[52]

La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de colesterol y el reclutamiento de macrófagos a la pared arterial, por lo tanto, puede considerarse una enfermedad tanto metabólica como inflamatoria.[65]

Se han identificado microorganismos orales en placas ateroscleróticas, que incluyen*, Veillonella spp., Neisseria spp, F. nucleatum, P. gingivalis, Estreptococo spp., T. forsythia, Chryseomonas, T. denticola* y *A. actinomycetemcomitans.* [65, 66]

Un estudio reciente, utilizando secuenciación de ARNr 16S, describió 84 taxones bacterianos diferentes detectados en ateroma y endotelio vascular de pacientes con enfermedad vascular aterosclerótica y enfermedad periodontal, contra solo 18 taxones diferentes detectados en pacientes con poca o ninguna enfermedad periodontal.[67]

3.2.5.3 Enfermedades del sistema digestivo

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Incluye varias enfermedades desde la colitis ulcerosa (CU) hasta la enfermedad de Crohn (EC). La CU se caracteriza por una inflamación continua, difusa y superficial del colon, mientras que la EC es una afección inflamatoria crónica que puede afectar diversas áreas del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, aunque suele incidir con mayor frecuencia en el colon y el íleon terminal.[68]

Un análisis reciente reveló que individuos con EII presentaban niveles significativamente más altos de Bacteroidetes y niveles más bajos de Proteobacterias en su microbiota salival. Además, se identificaron géneros predominantes, como *Haemophilus*, *Neisseria, Streptococcus, Gemella, Veillonella* y *Prevotella,* que contribuyeron notablemente a la alteración microbiana. Estudios más recientes también han sugerido que cepas de *Klebsiella spp*. de la microbiota salival pueden colonizar el intestino y desempeñar un papel en la inflamación intestinal crónica.[70]

Cáncer de esófago

Estudios demuestran que el patógeno periodontal *T. forsythia* puede estar asociado con un mayor riesgo de adenocarcinoma de esófago (ACE) y la abundancia del patógeno periodontal *P. gingivalis* posee tendencia con mayor riesgo de carcinoma de células escamosas de esófago (CCEE).[71]

La cantidad de ADN de *Streptococcus anginosus* es mayor en los tejidos del cáncer de esófago que en los tejidos del cáncer oral. Estos resultados sugieren que *S. anginosus*

tiene una estrecha relación con el cáncer de esófago, pero no está estrechamente asociado con el cáncer oral.[72]

Se evidencia que hay significativamente más ADN de *F. nucleatum* en los tejidos del cáncer de esófago que en la mucosa normal emparejada. También proporcionan la evidencia de que la positividad del ADN de *F. nucleatum* está significativamente asociada con el estadio del tumor y la supervivencia específica del cáncer.[73]

Cáncer colorrectal

Las bacterias orales asociadas al cáncer colorrectal (CCR), como *Peptostreptococcus, Parvimonas* y *Fusobacterium*, son más abundantes en el CCR que en los controles sanos.[74]

Se ha descubierto que *F. nucleatum*, un patógeno periodontal, es sobreabundante en el CCR. Se encontró que la abundancia de *F. nucleatum*, en el ADN fue 415 veces mayor en los tejidos de CCR que en los tejidos normales adyacentes.[75]

Otros grupos de bacterias orales, como *Porphyromonas, Peptostreptococcus, Prevotella, Parvimonas* y los géneros *Gemella*, también se encuentran asociados con el cáncer de colon*. T. denticola* y *Prevotella intermedia* se asocian con un mayor riesgo de CCR.[74, 76]

3.2.5.4 Enfermedades del sistema nervioso

Alzheimer

La enfermedad del alzheimer (EA) son trastornos neurodegenerativos y es el más común de demencia que causa alrededor del 60% al 80% de todos los casos, se caracteriza por un déficit cognitivo y tiene una etiología compleja y multifactorial.[77]

Las bacterias asociadas con la EA son principalmente patógenos periodontales, las placas formadas en la superficie de los dientes están compuestas principalmente por bacterias Gram-negativas, incluyendo *P. gingivalis, T. denticola, P. intermedia, Campylobacter rectus, A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia*.[78]

El estudio más completo al respecto es la asociación entre *P. gingivalis* y la enfermedad de Alzheimer. La *P. gingivalis* es el patógeno clave en la periodontitis, y se han detectado lipopolisacáridos y gingipaínas, la proteína tóxica producida por esta bacteria en el cerebro de pacientes con EA. Sin embargo, estas gingipaínas también estaban

presentes en los individuos no diagnosticados de EA, aunque en menor cantidad, lo que se sugirió que representaba una etapa preclínica asintomática de esta enfermedad.[79]

3.2.5.5 Enfermedades del sistema inmune

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno inflamatorio crónico de carácter autoinmune. Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial, la erosión de las articulaciones y la presencia de anticuerpos anti-proteína citrulinada.[80]

De hecho, los anticuerpos contra *P. gingivalis*, un patógeno periodontal bien conocido, se han asociado a individuos con estos autoanticuerpos positivos a un mayor riesgo de desarrollar AR. Otro microorganismo oral que se vinculó mecánicamente a la hipercitrulinación de autoantígenos en la AR es el *A. actinomycetemconitams.*[81, 82]

En un estudio del microbioma salival, los taxones que eran más abundantes en la AR en comparación con la osteoartritis incluyeron *Veillonella dispar, Actinobacillus parahaemolyticus, Neisseria subflava, Haemophilus parainfluenzae, Prevotella tannerae, Neisseria, Fusobacterium, Actinobacillus*, *Aggregatibacter* y *Prevotellaphilus*.[83]

Síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es un trastorno autoinmune caracterizado por la sequedad de la boca, los ojos, por la producción de autoanticuerpos y destrucción autoinmune de las glándulas lagrimales y salivales.[84]

Hay varios hallazgos de los microorganismos presentes en el SS, como el aumento de las abundancias relativas de filo Firmicutes y los géneros *Streptococcus, Lactobacillus, Prevotella, Atopobium*, pero disminuyó las abundancias relativas de filo Proteobacteria, Spirochaetes y géneros *Haemophilus, Leptotrichia, Fusobacterium, Lautropia y Neisseria*. La abundancia relativa reducida de *P. gingivalis* también está de acuerdo con estudios previos y explica la falta de aumento del riesgo de periodontitis en pacientes con SS, a pesar de la reducción de la función antimicrobiana salival.[85, 86, 87]

3.2.6 Cloruro de Cetilpiridinio (CPC)

3.2.6.1 Composición química

El cloruro de cetilpiridinio (CPC; nombre IUPAC: cloruro de 1-hexadecilpiridinio) es un compuesto monocationico de amonio cuaternario formado por nitrógeno cuaternario unido a una o más cadenas laterales hidrófobas.[88]

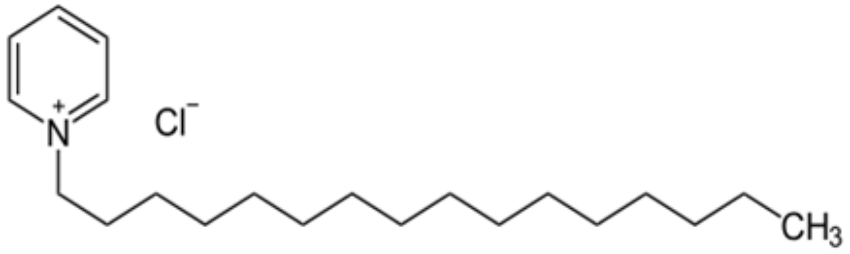


Figura 1. Estructura química del Cloruro de Cetilpiridinio (CPC)

3.2.6.2 Mecanismo de acción

La ubicación de la carga molecular en relación con las bacterias, que generalmente están cargadas negativamente, determina la actividad antimicrobiana. La parte hidrófila del CPC puede interactuar con la estructura celular, resultando en la eliminación de elementos celulares, la perturbación de procesos metabólicos, la restricción del crecimiento celular y, en última instancia, la apoptosis celular.[89]

Además, cualquier formulación que debilite o elimine la actividad del grupo catiónico podría inactivar este colutorio, ya que la región hidrofílica cargada positivamente es esencial para su acción antimicrobiana de amplio espectro. Por lo tanto, es crucial determinar qué productos de CPC son suficientemente activos desde el enfoque biológico para respaldar su adecuado potencial de prevenir la formación de biofilm bacteriano.[89, 90]

3.2.6.3 Seguridad y efectos secundarios

Existe suficiente información para respaldar la seguridad del CPC como antiséptico bucal cuando se utiliza en dosificaciones comprendidas entre el 0,045% y el 0,1%.[91]

La seguridad de los colutorios que contienen CPC se fundamenta en hallazgos de estudios farmacocinéticos y experimentos con animales, así como en los efectos secundarios evaluados en ensayos clínicos controlados con placebo. Además, se consideran posibles efectos secundarios imprevistos que, según el fabricante, puedan surgir después de la comercialización del producto.[92, 93]

Su prevalencia de efectos secundarios es inferior a la de la clorhexidina. Entre los resultados desfavorables se incluyen la decoloración de dientes, una irritación leve y temporal de la lengua y encías, así como el desarrollo de úlceras aftosas en determinados individuos.[94]

3.2.6.4 Efectividad del CPC contra el SARS CoV-2 (COVID-19)

Hay poca información sobre cómo interactúa el CPC con los virus. En la actualidad, son escasos los estudios clínicos que respalden la eficacia de estos colutorios contra el COVID-19.[95]

La eficacia del CPC contra los virus respiratorios aún no ha sido establecida, y hay una escasa base de evidencia clínica y preclínica en este aspecto, aunque investigaciones llevadas a cabo por el Centro Médico de los Hospitales Universitarios de Cleveland y la Universidad de Chicago indicaron que podría disminuir la capacidad infecciosa del virus de la gripe en un 50% después de 5 minutos de exposición y en un 90% a los 90 minutos.[96]

Actualmente, hay pocos estudios sólidos sobre el impacto de este colutorio sobre la concentración viral. El primer informe sobre la capacidad de los enjuagues bucales para reducir la cantidad de virus en la saliva se publicó en Corea. A pesar de estos escasos resultados, aún se recomiendan más estudios clínicos controlados con poblaciones más grandes que confirmen su eficacia.[97, 98]

Así, hasta el momento, no hay estudios disponibles que midan el impacto del uso de enjuagues bucales como el CPC en los microbiomas orales. El uso de estos antisépticos con fines antivirales que no han sido demostrados de manera confiable podría estar convirtiéndolos en disruptores del equilibrio microbiológico oral, por lo que no podrían recomendarse sin conocer sus verdaderas implicancias.[99]

3.3 Definición de términos

- **Ecosistema:** Es una entidad formada por organismos que están interconectados y que dependen unos de otros, coexistiendo en el mismo entorno.
- **Microbiota:** Es el conjunto de microorganismos vivos que forman el microbioma y que residen en un lugar particular (boca, colon, piel, etc.)
- **Microbioma:** Conjunto formado por toda la comunidad de microorganismos, sus genes y sus metabolitos, que interactúan entre sí con el huésped, lo que puede inducir a la manifestación de una respuesta fisiológica o patológica.
- **Genoma**: Es el conjunto completo de genes de un organismo, que incluye todo el material genético requerido para su desarrollo y funcionamiento.
- **Metagenoma:** Es la colección de material genético de una comunidad de microorganismos en un entorno específico, permitiendo estudiar la diversidad genética y funcional de dicho grupo sin necesidad de aislar cada organismo por separado.
- ***Metabarcoding:*** Es un método de evaluación de ADN que se utiliza para identificar y cuantificar las especies presentes en una muestra ambiental, empleando una secuenciación de fragmentos de genes específicos (marcadores) que son característicos de diferentes grupos de organismos.
- **Gen 16S:** Pertenece a la subunidad menor del ribosoma 30S, presente en todas las especies bacterianas. Los genes ARNr 16S, que lo codifican, se utilizan en estudios de microbiología y taxonomía para identificar y clasificar bacterias y arqueas.
- **Secuenciación:** Es el proceso de determinar el orden exacto de las bases nucleotídicas (A, C, G y T) en una cadena de ADN o ARN, cuya finalidad es decodificar la información genética, identificar genes, estudiar mutaciones y realizar investigaciones en genética y biología molecular.
- **Bioinformática**: Es la aplicación de tecnologías computacionales que se encarga de reunir, almacenar, organizar y analizar grandes cantidades de información correspondiente a las secuenciaciones biológicas.
- **Quimeras**: Durante el proceso de amplificación por PCR se pueden producir secuencias quiméricas, es decir, secuencias que no son productos reales de la amplificación del gen 16S. Es necesario eliminar estas secuencias irreales empleando programas bioinformáticos.

- **Basecalling:** Es el proceso de convertir señales eléctricas detectadas en la secuenciación, donde una hebra de ADN atraviesa por el nanoporo. Estas señales se procesan con algoritmos computacionales para identificar la secuencia de nucleótidos de la molécula.
- **OTUs:** "Operational Taxonomic Units" (Unidades Taxonómicas Operativas), son herramientas utilizadas para agrupar secuencias de ADN que comparten similitudes en su secuencia genética, lo que permite la identificación y clasificación taxonómica, facilitando el análisis posterior para el cálculo y visualización de la diversidad y composición de los organismos microbianos.

3.4 Hipótesis

No se considera hipótesis por el tipo de investigación.

3.5 Operacionalización de variables

Variable	Definición Conceptual	Dimensiones	Indicadores	Valores	Escala
Taxones bacterianos del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC)	Es la identificación y cuantificación de los microorganismos bacterianos encontrados en el microbioma oral antes y una semana después de haber utilizado el enjuague bucal de CPC.	Diversidad de especies bacterianas	Secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S Análisis Bioinformático	Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs)	Nominal
		Cantidad de especies bacterianas		Abundancia Relativa (%)	De Razón

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de investigación

El presente estudio fue de tipo:

- **Descriptivo:** debido a la explicación de las características de un área de interés.
- **Observacional:** es fundamental destacar que este estudio se enmarca dentro de un diseño observacional, ya que el factor de estudio no estuvo bajo control directo del investigador. No se ha implementado un grupo de control ni se ha manipulado ninguna variable. En otras palabras, la información se recopiló tal y como se presenta en el protocolo establecido de la clínica odontológica en particular, el cual se encuentra detallado en el Anexo 1. La información se recabó y registró con el propósito de realizar un análisis posterior, sin alterar las condiciones originales del acontecimiento clínico.
- **Longitudinal:** debido a que la variable se midió en distintos momentos.
- **Prospectivo:** los datos se analizaron transcurrido un determinado tiempo en el futuro.
- **Transdisciplinar:** porque compartió un análisis de forma conjunta con otras disciplinas.

4.2 Población y muestra

4.2.1 Población

La población estuvo conformada por los pacientes clínicamente sanos que acudieron a una Clínica Odontológica Privada.

4.2.2 Muestra

La muestra estuvo conformada por 12 pacientes clínicamente sanos que utilizaron el enjuague bucal de CPC como parte del protocolo de la Clínica Odontológica Privada.

4.2.2.1 Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra se determinó en base a los antecedentes de la investigación. Cabe resaltar que, un tamaño de muestra grande proporciona información más precisa para una población de estudio, sin embargo, varios estudios apoyan el tamaño de muestra que tomaremos para analizar el microbioma oral (Verma *et al*., 2021), (Bescos *et al.*, 2020), (Omori *et al.*, 2020).

4.2.2.2 Unidad de análisis

Las muestras de saliva de los pacientes clínicamente sanos que acudieron a una Clínica Odontológica Privada.

4.2.2.3 Selección de la Muestra

Para la selección de la muestra se utilizó el tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia, cumpliéndose los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años de edad.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.
- Pacientes sistémicamente sanos, sin signos de gingivitis o periodontitis, ausencia de caries dental activa u otras lesiones orales.

Criterios de exclusión:

- Pacientes fumadores, alcohólicos o masticadores de tabaco.
- Pacientes con aparatología bucal (brackets, prótesis removibles)
- Pacientes que estén utilizando algún tipo de enjuague bucal como parte de su rutina de higiene oral, días previos a la toma de muestra.
- Pacientes que se les haya indicado antibioticoterapia por cualquier motivo tres meses previos a la toma de muestra.

4.3 Técnicas y procedimientos

4.3.1 Previo a la toma de muestras

La selección de los participantes previa a la recolección de la muestra se llevó a cabo mediante el empleo de fichas de registro de datos, las cuales fueron completadas con información extraída de las historias clínicas de cada paciente, considerando los datos pertinentes conforme a los criterios preestablecidos de inclusión y exclusión, es decir, se identificó a los pacientes clínicamente sanos con buena salud bucal, ausencia de inflamación preexistente en los tejidos orales y sin ninguna enfermedad sistémica subyacente. Todos los pacientes aceptaron y firmaron el consentimiento informado. Estas acciones se llevaron a cabo después de enviar una solicitud formal de aceptación para la realización del estudio, la cual se detalla a continuación:

La solicitud de aceptación fue dirigida a la Clínica Odontológica Privada, con el fin de establecer los permisos y las fechas de visitas coordinadas anticipadamente. De esta

manera se pudo recolectar las muestras de los pacientes seleccionados. Así mismo, se coordinó con el director encargado del laboratorio de Bioinformática y Genómica de la Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, días previos al traslado y almacenamiento de las muestras realizadas.

4.3.2 Procedimiento de recolección de muestras

Se procedió a la recolecta de las muestras cuyo procedimiento fue exactamente igual en ambos momentos, antes y después de una semana de haber iniciado el uso de cloruro de cetilpiridinio (CPC), es decir, luego de 7 días de haber realizado enjuagues bucales, con 15 mL de colutorio de CPC al 0,07%, durante 1 minuto, dos veces al día, por la mañana y por la noche, según el protocolo de uso de la Clínica Odontológica Privada.

Para la recolección de la muestra se utilizaron tubos de polipropileno estériles. El paciente acumuló saliva no estimulada en la boca y luego vertió de manera vertical hasta alcanzar un llenado de aproximadamente 3 mL. Cada muestra de los pacientes antes del uso del colutorio, fue rotulada de la siguiente manera: A1 (paciente #01 antes del uso del CPC) hasta A12 (paciente #12 antes del uso del CPC). De igual manera, para las muestras de los mismos pacientes luego de una semana después del uso del colutorio: D1 (paciente #01 después del uso del CPC) hasta D12 (paciente #12 después del uso del CPC).

4.3.3 Procedimiento de laboratorio

4.3.3.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN metagenómico, utilizando el kit comercial Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en condiciones asépticas durante todo el proceso.

En detalle, se transfirieron 3 mL de saliva no estimulada a tubos pequeños de microcentrífuga en dos cantidades de 1.3 mL (650 µL x2) utilizando micropipetas calibradas. Ambos tubos fueron sometidos a una centrifugación a 13,000 rpm durante 5 minutos, resultando en la formación de un *pellet* en la base, el cual fue separado del sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 200 µL de DNA Elution Buffer a cada tubo, se agitó vigorosamente por 15 segundos en un vórtex para lograr la completa disolución del *pellet*, obteniendo un líquido homogéneo. Se seleccionó el tubo con la mayor homogeneidad, se centrifugó y se transfirieron 200 µL a otro tubo. A este último se le adicionaron 200 µL de una solución Red (BioFluid & Cell Buffer) y 20 µL de Proteinasa K, se agitó por 10 segundos en vórtex y se incubó a 55°C durante 10 minutos.

Después de la incubación, se añadieron 420 µL de Genomic Binding Buffer al tubo, se agitó por 10 segundos en vórtex, y la mezcla se transfirió al sistema "Zymo-Spin™ IIC-XLR Column + Collection Tube" del kit de extracción de ADN (matriz + tubo desechable). Se centrifugó a 15, 000 *x g* por 10 minutos, verificando que no quede ningún lisado y descartando el “Collection Tube”. Posteriormente, se repitieron los pasos añadiendo 400 µL de DNA Pre-Wash Buffer, 700 µL de g-DNA Wash Buffer y nuevamente 200 µL de g-DNA Wash Buffer, asegurándose de eliminar cualquier residuo. La matriz resultante se trató con 70 µL de DNA Elution Buffer, colocando debajo un tubo de centrífuga estéril. Tras incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugó a la velocidad máxima de 15,000 rpm por 1 minuto. Finalmente, las extracciones de ADN resultantes se utilizaron y almacenaron inmediatamente a 4°C o -20°C por los siguientes días mientras se evaluaba la calidad y concentración del mismo.

4.3.3.2 Determinación de calidad y concentración del ADN

Para determinar la calidad y concentración de ADN aislado se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop™ One C (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Se utilizó 2 µL de cada muestra. Además, la integridad del ADN se evaluó por electroforesis mediante un fotodocumentador Uvidoc HD6 (Uvitec Cambridge, Reino Unido) utilizando geles de agarosa al 1%, también con 2 µL de muestra, la cual se tiñó con el intercalante GelRed® (Biotium, California, Estados Unidos).

4.3.3.3 Secuenciación Molecular: Kit Barcoding ARNr 16S

Amplificación por PCR y preparación de la librería de secuenciación

Tanto para la amplificación como para la preparación de la librería de secuenciación se utilizó el kit comercial 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024, Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), siguiendo el protocolo indicado para las celdas de flujo Flongle.

La PCR se realizó utilizando primers universales para la amplificación del gen 16S de longitud completa (~1500 pb) y su posterior aislamiento, los cuales venían con el kit antes mencionado. Para este proceso se utilizó 10 µL del ADN en una concentración estandarizada de 2 ng/µL para cada muestra, junto con 5 µL de agua libre de nucleasas y 10 µL de primer. También se adicionó 25 µL de LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (New England BioLabs, Estados Unidos) a cada muestra. El protocolo de PCR constó una desnaturalización inicial a 95 °C por un minuto, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 20 segundos, 25 ciclos de alineamiento a 55 °C por 30 segundos y 25 ciclos de extensión a 65 °C por 2 minutos, y con una extensión final a 65

°C por 5 minutos. Posteriormente, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% con 1 µL de cada muestra para la detección de bandas íntegras y brillantes.

Terminada la PCR, cada muestra fue purificada por separado con perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, Estados Unidos) y se prosiguió con el protocolo de preparación de librerías según las indicaciones del productor. Como parte del proceso, las 24 muestras fueron combinadas en concentraciones equimolares, pudiendo ser identificadas gracias a etiquetas (barcoding o multiplexación) incluidas en el kit. Se obtuvo 10 µL de ADN preparado, al cual se le agregó 1 µL de adaptador, finalizando la librería.

Secuenciamiento de Nanoporos

Finalmente, la librería se secuenció con la tecnología de tercera generación nanoporos. Para esto se utilizó el secuenciador MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) junto a las celdas de flujo Flongle FLO-FLG001 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Se cargó la mitad de la librería en la celda de flujo y se colocó en el secuenciador, el cual se programó para que realice la secuenciación por 10 horas. Después de la carga, la configuración del equipo fue la predeterminada. Las lecturas fueron separadas en exitosas y fallidas según un mínimo de Q score de 9. Se usó el modelo de Super High-Accuracy para la interpretación de señales eléctricas en pares de bases (*basecalling).* Tras lo cual se obtuvieron archivos en el formato FAST5.

4.4 Procesamiento de datos

El procesamiento de datos de la secuenciación por nanoporos, se estableció mediante archivos FAST5 utilizando el software Guppy v6.5.7 con un algoritmo superpreciso (SUP) en una computadora Workstation Lenovo ThinkStation serie P.

Control de calidad y demultiplexación

Luego, para el análisis inicial de estas lecturas largas generadas por secuenciación de nanoporos, se usó el algoritmo FASTQ 16S del software EPI2ME Labs. Este análisis consistió en un riguroso control de calidad y eliminación de quimeras en base a un umbral de calidad y longitud, la separación de las lecturas correspondientes a cada muestra (demultiplexación) y la agrupación por nivel taxonómico, el cual se empleó flujos de trabajo creados previamente de una base de datos.

En este caso, se usaron los parámetros predeterminados, con un mínimo de Q Score de 9 y con un mínimo de longitud de lectura de 200pb. Para la comparación y alineamiento de estas secuencias se empleó el algoritmo bioinformático BLAST, para

ello se estableció un mínimo de cobertura e identidad de 30 % y 70 %, respectivamente, y un umbral de valor E=0.01, para que sea considerada exitosa.

4.5 Análisis de resultados

4.5.1 Análisis Bioinformático

Entonces, una vez obtenidas las lecturas de alta calidad, se utilizó el software TaxonKit de la base datos del NCBI para obtener tablas de taxonomía que contienen información sobre los nombres, clasificaciones y relaciones taxonómicas de los organismos detectados en las secuencias.

A partir de estas tablas de taxonomía, se creó dos archivos: uno para los conteos de cada "taxid" por cada "barcode o muestra" y otro para la tabla de taxonomía que agrupaba los únicos "taxid". Además, se diseñó una tabla de muestreo o metadatos basada en el diseño de la investigación.

Seguidamente, en base a estos tres archivos (conteos, taxonomía, metadatos) se procedió a los análisis de diversidad en el software de programación R v.4.2.1. Este proceso implicó la utilización de diferentes funciones de programación, así como la aplicación de paquetes estadísticos que son cruciales para el análisis. Además, estos recursos proporcionan resúmenes de las características significativas a nivel de las comunidades microbianas.

Índice de diversidad alfa

Se estimaron los índices de diversidad alfa de Chao1 (abundancia), Shannon (diversidad) y Simpson (equitatividad), utilizando el paquete Phyloseq, con la función plot_richness(), mediante la creación de un diagrama de cajas, que permitieron ver si existen diferencias significativas en los grupos antes y después del uso de CPC.

Índice de diversidad beta

Para estimar la diversidad beta, se normalizó la matriz de OTUs utilizando el método de transformación estabilizadora de varianza (VST), disponible en el paquete DESeq2. Para ello, se creó un gráfico de Análisis de coordenadas principales (PCoA) con la función plot_ordination(), elaborado a partir de la abundancia de especies para el análisis de similitud entre grupos de muestreo.

Tablas y diagramas de barras apiladas

Para la exploración de las comunidades microbianas en las diferentes muestras, se crearon gráficas de barras apiladas con la función ggplot(), que representaron la

diversidad y abundancia relativa de cada grupo taxonómico a nivel de phylum, género y especie. Los datos utilizados para esta representación se extrajeron de archivos bioinformáticos y se exportaron en formato “.csv” (archivos que almacenan una gran cantidad de datos en tablas separadas por comas), posteriormente convertidos a formato “.xlxs” (archivos de hoja de cálculo del programa Microsoft Excel), con el propósito de facilitar su manejo.

Por otro lado, la variación de la abundancia relativa antes y después del uso del CPC fue analizada empleando el programa estadístico SPSS Stadistics versión 26.0, reportándose la media y desviación estándar. La distribución normal de la muestra se evaluó mediante la prueba de Anderson-Darling en el software Minitab 19. Las diferencias entre el antes y después se analizaron mediante la prueba T de Student pareadas (datos con distribución normal) o la prueba de Wilcoxon (datos con distribución no normal). Se utilizó un nivel de significancia establecido en $p \leq 0.05$.

V. RESULTADOS

5.1 Codificación de muestras

A continuación, se proporciona la información completa con los códigos asignados a los pacientes para cada muestra, tanto para el antes (A1-A12) y una semana después del uso del enjuague bucal de CPC (D1-D12) detallada en la Tabla 1.

Tabla 1. Codificación de las 24 muestras (12 antes y 12 después)

Muestra	Código Antes del Enjuague	Código Después del Enjuague
Paciente #01	A1	D1
Paciente #02	A2	D2
Paciente #03	A3	D3
Paciente #04	A4	D4
Paciente #05	A5	D5
Paciente #06	A6	D6
Paciente #07	A7	D7
Paciente #08	A8	D8
Paciente #09	A9	D9
Paciente #10	A10	D10
Paciente #11	A11	D11
Paciente #12	A12	D12

5.2 Registro de la purificación de la extracción del ADN

Terminada la extracción de ADN, la calidad y concentración de ADN se cuantificó mediante fotometría. Para muestras con una concentración >20 ng/µL, se recomienda que la muestra de ADN tenga una calidad o pureza semejante a 1.80-A260/280 (valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm) adecuadas para ser secuenciadas. Así mismo, se asignó los barcode o códigos de barras que ayudan a identificar a que muestra corresponde exactamente cada una de ellas (Tabla 2).

Tabla 2. Barcode (código para la preparación de librerías), código, concentración y calidad del ADN extraído de las muestras en NanoDrop™.

Barcode	Código	Concentración (ng/µL)	Calidad (A260/A280)
1	A1	109.1	1.85
2	A2	43.7	1.88
3	A3	83.3	1.86
4	A4	62.9	1.86
5	A5	80.3	1.84
6	A6	115.3	1.88
7	A7	92	1.90
8	A8	83.4	1.89
9	A9	109.2	1.87
10	A10	27.6	1.97
11	A11	67.2	1.85
12	A12	112.2	1.86
13	D1	115.8	1.87
14	D2	76.3	1.88
15	D3	99.1	1.87
16	D4	108.1	1.87
17	D5	84.6	1.85
18	D6	78.2	1.85
19	D7	85	1.86
20	D8	78.2	1.87
21	D9	57.4	1.88
22	D10	19.0	1.86
23	D11	25.2	1.84
24	D12	89.8	1.85

Posteriormente a la amplificación de las muestras por PCR se determinó de acuerdo al análisis por electroforesis, la visualización de la integridad del ADN se realizó utilizando geles de agarosa 1%, en la cual se encontraban mayormente íntegros como una sola banda brillante, adecuadas para la preparación de librerías y posterior secuenciamiento (Figura 2).

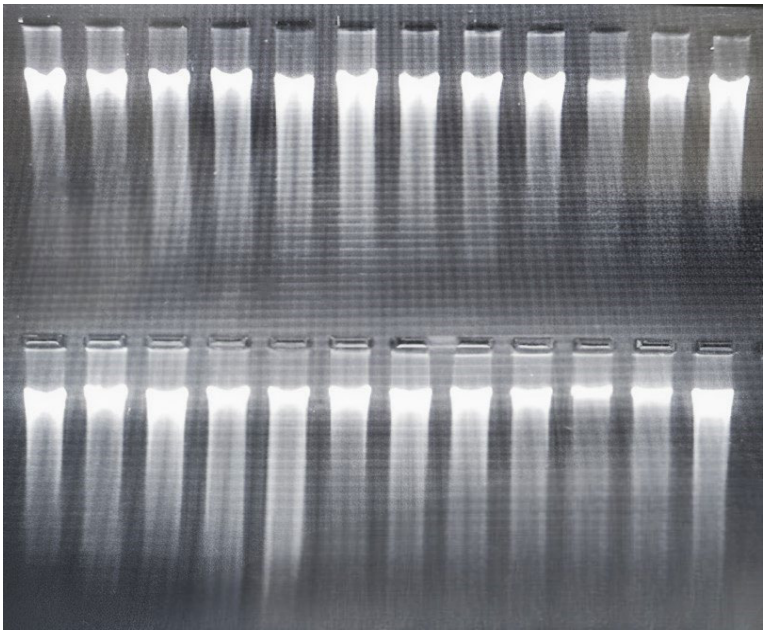


Figura 2. Electroforesis de ADN producto de la PCR de las 12 muestras antes (superior) y 12 muestras después (inferior)

5.3 Resultado de la Secuenciación por Nanoporos

Se secuenciaron 153.55k lecturas. El promedio de lecturas fue 6.4k ±0.6k lecturas. Mediana: 6.3k. Máximo: 7.6k lecturas. Mínimo: 5.1k lecturas.



Figura 3. Número de lecturas por muestra en la secuenciación por nanoporos

La longitud de las lecturas estuvo alrededor de lo esperado para el gen 16S (1.5 kb). El número de poros disponible y la actividad a lo largo de la secuenciación se mantuvo relativamente constante, aparte que hubo un decaimiento acelerado en la actividad de los poros del MinION. Sin embargo, el Q Score y la velocidad a la que el ADN pasa por el poro también fueron sostenidos y por encima del rango aceptado en promedio.

5.4 Análisis de la diversidad y composición del microbioma oral

Los resultados de la identificación mediante EPI2ME fueron exportados en formato .csv y manipulados para remover lecturas no clasificadas durante el paso de demultiplexación, y lecturas no identificadas por BLAST (Anexo 7).

Con todos estos datos precisos y mediante el análisis bioinformático que nos proporcionó tablas de taxonomía, tablas de conteo y metadatos (Anexo 8), seguido de un análisis estadístico, se logró identificar a todos los taxones bacterianos (OTUs) presentes en las muestras quienes facilitaron el análisis posterior, permitiendo calcular y visualizar la diversidad y la composición de los microorganismos identificados, Los resultados de este análisis se expresaron mediante índices de diversidad alfa y beta, así como la abundancia relativa, los cuales se presentan a continuación.

5.4.1 Análisis de la diversidad del microbioma oral

En relación a los índices de diversidad alfa basados en OTUs (Figura 4), la evaluación la hacemos considerando la comparación por pares (antes y después), podemos visualizar que los índices de Chao1, Shannon y Simpson fueron significativamente menores, es decir disminuyó en valores de abundancia, diversidad y equitatividad respectivamente, para las muestras después de una semana del uso del enjuague bucal de CPC en comparación con las muestras antes del uso de este colutorio.

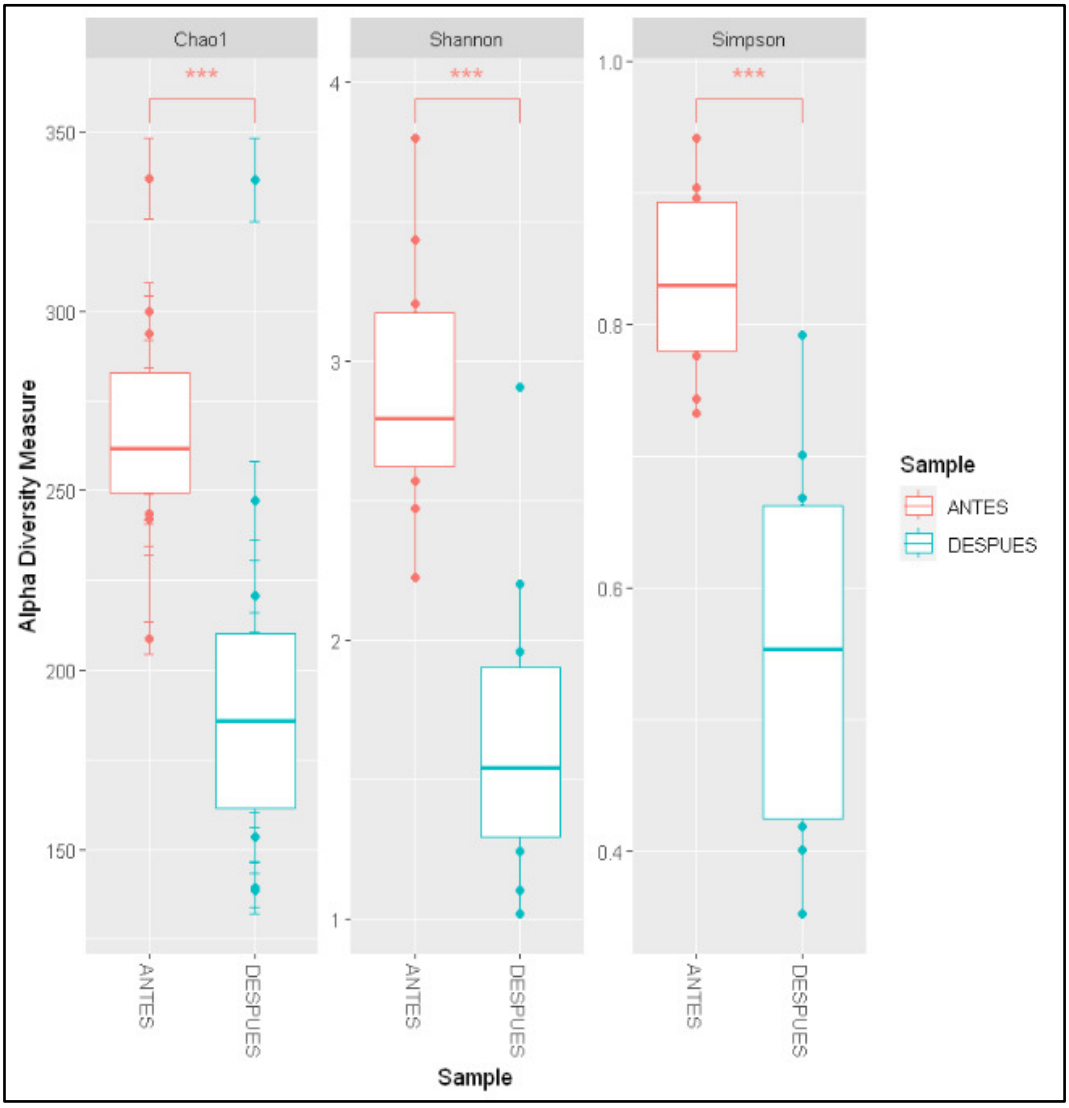


Figura 4. Índices de diversidad alfa, Chao1 (abundancia), Shannon (diversidad) y Simpson (equitatividad) en conjunto de todas las muestras antes y una semana después del uso del CPC. ***: $p \leq 0.05$

Referente al análisis de coordenadas principales (PCoA) de OTUs que muestran similitudes entre grupos de muestras. De manera general, en todos los muestreos (Figura 5), se observa agrupación en algunas muestras antes (A7, A8, A12), así mismo observamos agrupación en algunas muestras después (D3, D7, D9) lo que evidencia similitud de lo encontrado en estos puntos y finalmente las muestras restantes en donde se observa una ligera dispersión o separación de los puntos.

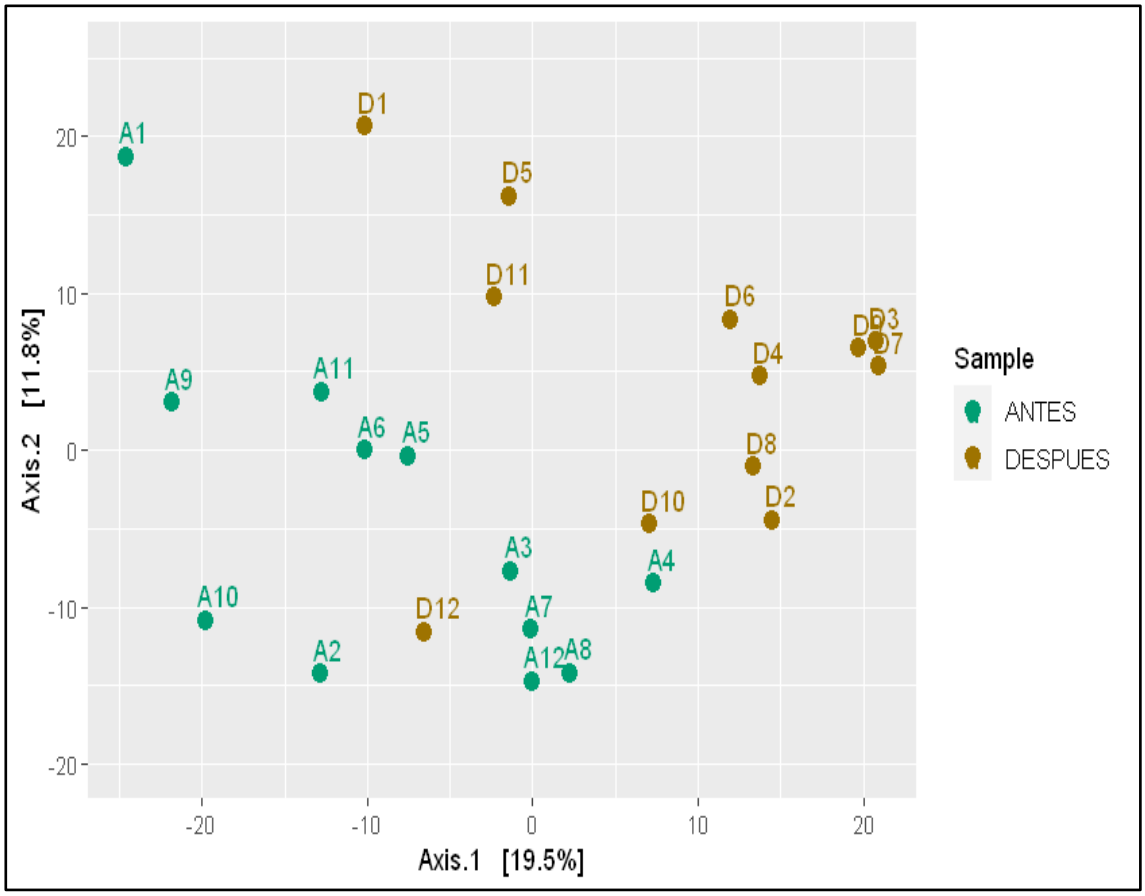


Figura 5. Índice de diversidad beta, Escalado Multidimensional o PCoA en todos los muestreos respecto a las muestras antes y una semana después del uso del CPC.

5.4.2 Análisis de la composición taxonómica del microbioma oral

Tabla 3.

Abundancia relativa del microbioma oral según phylum, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC)

Taxon		Antes	Después	p
Campylobacterota	Media	1.65%	0.54%	0.019 (W)
	SD	1.44	0.59	
Firmicutes	Media	28.54%	8.16%	0.002 (T)
	SD	19.63	9.41	
Bacteroidetes	Media	5.11%	0.72%	0.002 (W)
	SD	3.96	0.54	
Proteobacterias	Media	62.51%	90.05%	0.001 (T)
	SD	23.00	10.59	
Fusobacteria	Media	1.84%	0.38%	0.001 (T)
	SD	1.38	0.35	
Other	Media	0.36%	0.15%	0.008 (W)
	SD	0.16	0.11	

SD=desviación estándar; T=t-Student, W=Wilcoxon

La tabla 3 muestra los valores de abundancia relativa del microbioma oral según phylum, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC). Los phylum más abundantes en el grupo antes del uso de CPC son Proteobacteria (62,51%) y Firmicutes (28,54%), después de ellos fueron Bacteroidetes (5,11%), Campylobacterota (1,65%) y Fusobacteria (1,84%). Por otro lado, después del uso de CPC se encontró un aumento significativo de Proteobacteria (90,05%), mientras que se observó una disminución considerable de Firmicutes (8,16%) y Bacteroidetes y en menor cantidad Campylobacterota (0,54%) y Fusobacteria (0,38%). En los cinco principales phylum, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

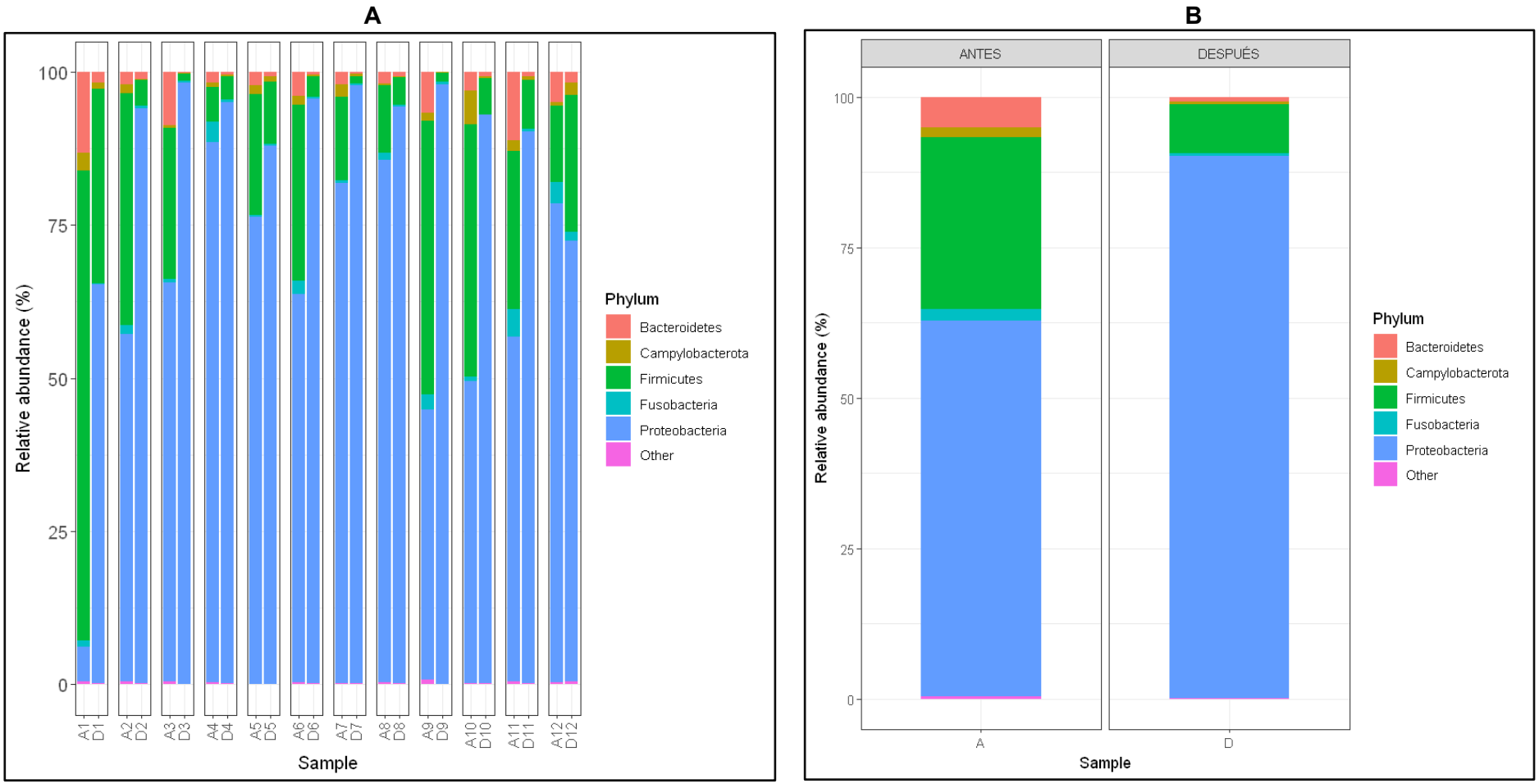


Figura 6. Diagrama de barras apiladas que representa los taxones y sus abundancias relativas calculadas a partir de las lecturas totales. **A.** Composición de los phylum más abundantes en las diferentes muestras agrupadas y comparadas para cada paciente, denominadas A1-D1 hasta A12-D12. **B.** Abundancia relativa del microbioma oral según Phylum, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de CPC.

Tabla 4.

Abundancia relativa del microbioma oral según género, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC)

Taxon		Antes	Después	p
Campylobacter	Media	1.62%	0.54%	0.019 (W)
	SD	1.44	0.59	
Neisseria	Media	7.48%	4.53%	0.182 (W)
	SD	7.45	5.31	
Veillonella	Media	15.94%	4.35%	0.001 (T)
	SD	13.15	6.03	
Prevotella	Media	2.65%	0.34%	0.002 (W)
	SD	3.70	0.42	
Haemophilus	Media	43.29%	72.10%	0.000 (T)
	SD	14.85	11.17	
Aggregatibacter	Media	2.15%	0.70%	0.005 (W)
	SD	1.89	0.73	
Fusobacterium	Media	1.58%	0.34%	0.002 (W)
	SD	1.40	0.32	
Streptococcus	Media	7.38%	1.97%	0.016 (T)
	SD	6.90	2.42	
Unclassified	Media	12.75%	13.16%	0.657 (T)
	SD	5.27	3.16	
Other	Media	5.17%	1.97%	0.005 (T)
	SD	2.25	1.80	

SD=desviación estándar; T=t-Student, W=Wilcoxon

La tabla 4 muestra los valores de abundancia relativa del microbioma oral según género, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC). Los géneros más predominantes son *Haemophilus* (43,29%), *Veillonella* (15,94%) y *Neisseria* (7,48%). Después de ellos fueron *Streptococcus* (7,38%), *Prevotella* (2,65%), *Agregatibacter* (2,15%), *Campylobacter* (1,62%) y *Fusobacterium*

(1,58%). Sin embargo, después del uso de CPC, observamos un cambio interesante en la composición. *Haemophilus* (72,10%) experimenta un aumento significativo en su abundancia relativa, lo que sugiere que el CPC podría estar afectando específicamente a este grupo bacteriano. Por otro lado, géneros bacterianos como *Veillonella* (4,35%), *Neisseria* (4,53%), *Streptococcus* (1,97%), *Prevotella* (0,34%), *Agregatibacter* (0,70%), *Campylobacter* (0,54%) *y Fusobacterium* (0,34%) muestran una disminución en su abundancia relativa después del uso de CPC. Es importante destacar que, se detectó la presencia de otros microorganismos, incluyendo aquellos que no han sido clasificados previamente, que de igual forma presentan una cantidad estimable en las diferentes muestras analizadas. Entre los principales géneros, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), a excepción de *Neisseria* y “Unclassified”.

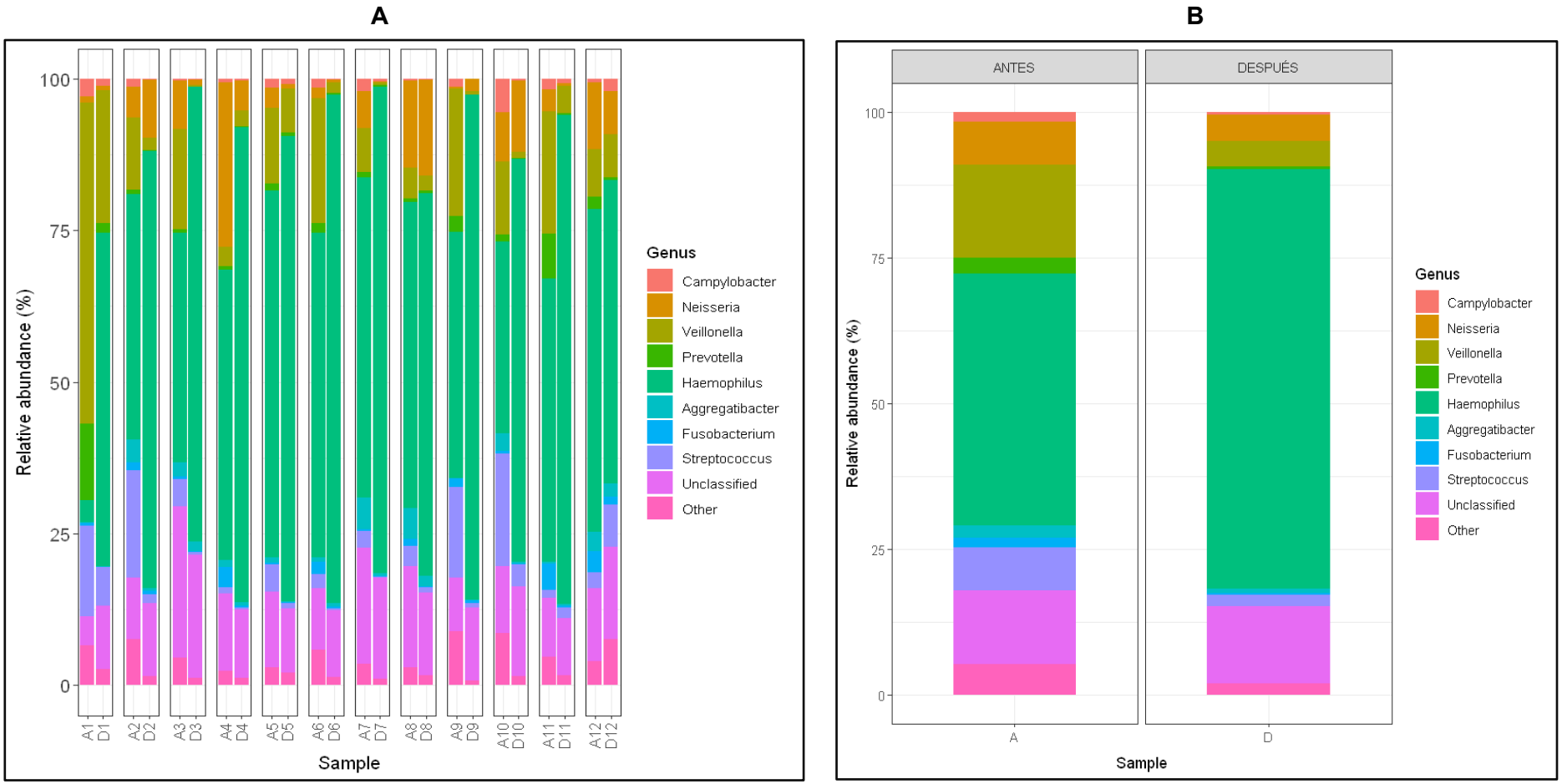


Figura 7. Diagrama de barras apiladas que representa los taxones y sus abundancias relativas calculadas a partir de las lecturas totales. **A.** Composición de los géneros más abundantes en las diferentes muestras agrupadas y comparadas para cada paciente, denominadas A1-D1 hasta A12-D12. **B.** Abundancia relativa del microbioma oral según Género, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de CPC.

Tabla 5.

Abundancia relativa del microbioma oral según especie, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC)

Taxon		Antes	Después	p
Neisseria macacae	Media	1.29%	1.28%	0.505 (W)
	SD	1.46	2.51	
Haemophilus haemolyticus	Media	2.77%	0.81%	0.012 (W)
	SD	3.25	0.87	
Haemophilus parahemolyticus	Media	2.97%	2.62%	0.433 (W)
	SD	3.51	2.40	
Neisseria perflava	Media	5.28%	2.57%	0.099 (W)
	SD	6.60	3.66	
Veillonella atypica	Media	2.82%	1.01%	0.006 (W)
	SD	5.62	2.44	
Veillonella dispar	Media	4.05%	1.09%	0.005 (W)
	SD	6.17	2.37	
Veillonella parvula	Media	4.56%	0.94%	0.001 (T)
	SD	2.59	0.82	
Prevotella melaninogenica	Media	1.40%	0.12%	0.002 (W)
	SD	2.08	0.14	
Streptococcus parasanguinis	Media	0.64%	0.24%	0.114 (W)
	SD	1.49	0.48	
Haemophilus parainfluenzae	Media	33.79%	63.97%	0.002 (W)
	SD	13.11	11.50	
Haemophilus sputorum	Media	0.79%	3.56%	0.014 (T)
	SD	0.63	3.11	
Veillonella tobetsuensis	Media	2.04%	0.75%	0.005 (W)
	SD	2.02	0.93	
Veillonella massiliensis	Media	1.15%	0.03%	0.004 (W)
	SD	2.11	0.06	
Haemophilus seminalis	Media	2.16%	0.43%	0.019 (W)
	SD	2.61	0.48	
Veillonella nakazawae	Media	0.71%	0.33%	0.033 (T)
	SD	1.13	0.72	
Streptococcus toyakuensis	Media	1.64%	0.22%	0.007 (W)
	SD	2.16	0.38	
Unclassified	Media	12.66%	13.10%	0.634 (T)
	SD	5.26	3.13	
Other	Media	19.30%	6.95%	0.000 (T)
	SD	7.04	5.29	

SD=desviación estándar; T=t-Student, W=Wilcoxon

La tabla 5 muestra los valores de abundancia relativa del microbioma oral según especie, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro cetilpiridinio (CPC). Las especies más abundantes antes del uso de CPC son *Haemophilus parainfluenzae* (33,79%), *Neisseria perflava* (5,28%), *Veillonella parvula* (4,56%), *Veillonella dispar* (4,05%), *Haemophilus haemolyticus* (2,77%), *Streptococcus toyakuensis* (1,64%), *Prevotella melaninogenica* (1,40%), *Haemophilus sputorum* (0,79%). Por otro lado, después del uso de CPC se encontró se encontró un aumento significativo de esta misma especie *Haemophilus parainfluenzae* (63,97%) y de *Haemophilus sputorum* (3,56%), mientras que se observó una disminución considerable de *Neisseria perflava* (2,57%), *Prevotella melaninogenica* (0,12%), *Veillonella parvula* (0,94%), *Veillonella dispar* (1,09), *Haemophilus haemolyticus* (0,81%), *Streptococcus toyakuensis* (0,22%). También es importante destacar el descubrimiento de la presencia de otras especies, así como las no clasificadas que representan una cantidad estimable en nuestras muestras. En las principales especies descritas, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), con la excepción de *Neisseria macacae, Haemophilus parahemolyticus, Streptococcus parasanguinis* y “Unclassified”.

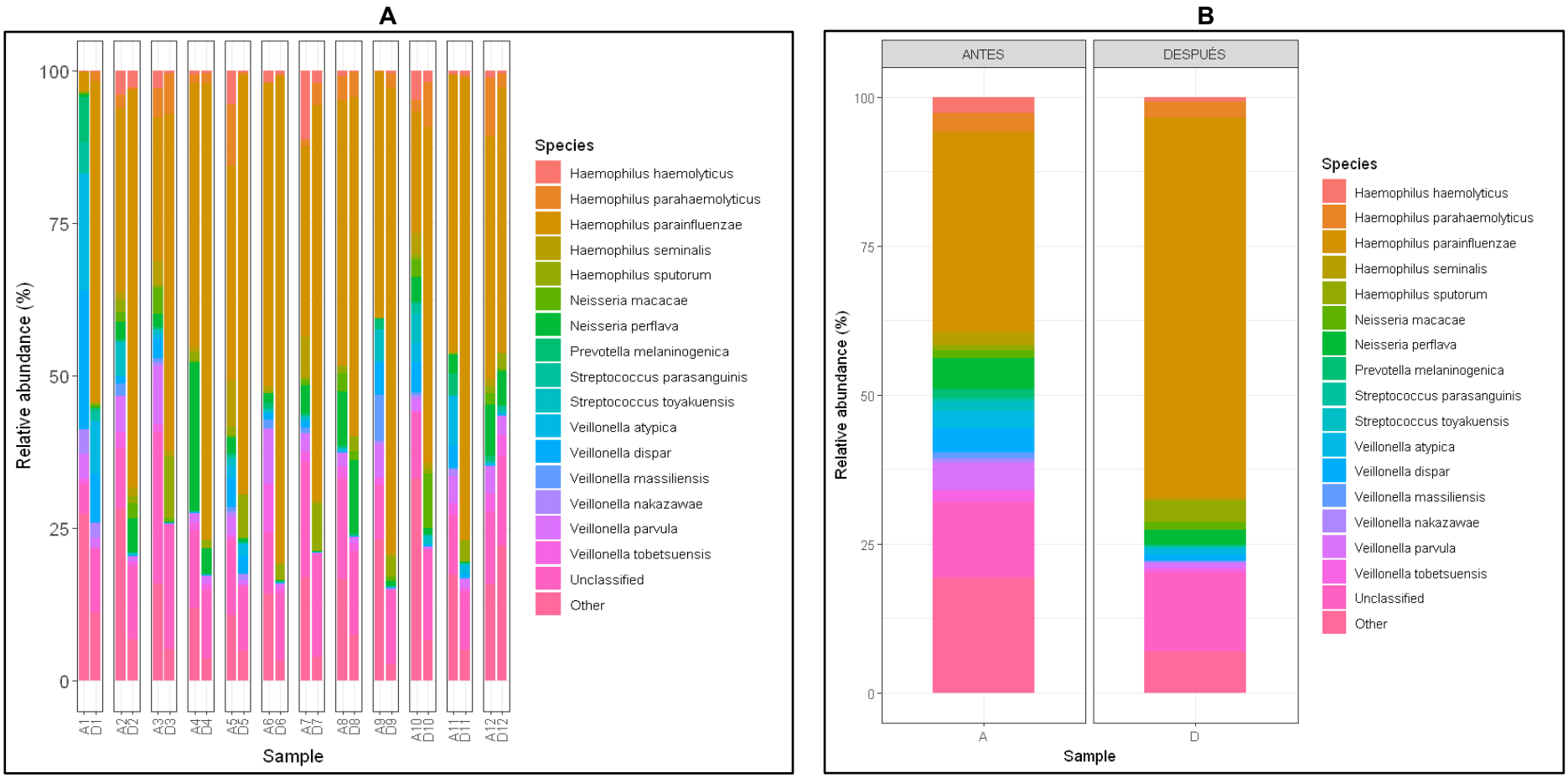


Figura 8. Diagrama de barras apiladas que representa los taxones y sus abundancias relativas calculadas a partir de las lecturas totales. **A.** Composición de las especies más abundantes en las diferentes muestras agrupadas y comparadas para cada paciente, denominadas A1-D1 hasta A12-D12. **B.** Abundancia relativa del microbioma oral según Especie, antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de CPC

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona una investigación sobre el análisis de la composición microbiana antes y una semana después en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC). Se realizó la identificación taxonómica de la comunidad microbiana a partir de muestras de saliva, empleando secuenciación de tercera generación (Oxford Nanopore Technologies) de la secuencia completa del gen ARNr 16S.

La secuenciación metagenómica ha mejorado considerablemente la identificación de especies microbianas, que normalmente mediante otras técnicas convencionales como de cultivos en el laboratorio sería imposible la exploración de esta diversidad de bacterias presentes en una muestra. Se han realizado diferentes investigaciones con la finalidad de conocer la diversidad bacteriana del microbioma oral, además últimamente se ha mostrado gran interés por el estudio y la aplicación de estas nuevas tecnologías al campo de las ciencias de la salud en específico de la microbiología oral.[18, 19, 20]

Hasta el momento, este es el primer estudio en el Perú que se enfoca de manera completa en investigar la amplia diversidad de la comunidad de microorganismos, demostrando el impacto del uso de CPC durante una semana en el microbioma oral a través de técnicas moleculares, específicamente utilizando *metabarcoding* del gen ARNr 16S, con la plataforma de secuenciación por Nanoporos de lectura larga, a diferencia de los estudios de Liu *et al.* (2023)[16], Verma *et al.* (2021)[18], Bescos *et al.* (2020)[19], Omori *et al.* (2020)[20] y May *et al.* (2018)[22], los cuales emplearon la secuenciación por Miseq Ilumina de lectura corta, lo que también demuestra la alta eficiencia de ambas metodologías.

Ahora bien, existen diferentes técnicas para la colecta de muestras de saliva y su posterior extracción de ADN, que nos garantizan un buen desempeño en los resultados, estas van desde colectas de saliva estimulada y no estimulada como los hizo Omori *et al.* (2020)[20] y Jo *et al.* (2019)[100] e inclusive otra alternativa es de los mismos enjuagues bucales como indican Verma *et al.* (2021)[18 y] Fan *et al.* (2018)[101] en sus artículos. Sin embargo, aún no se ha establecido un protocolo estándar para la recolección de muestras orales para respaldar la investigación del microbioma oral. Así pues, en el caso presente, se realizó la recolección de muestras de saliva no estimuladas, el cual es considerado una forma de colecta objetiva y confiable de igual modo como lo realizó Bescos *et al.* (2020)[19].

Si bien es cierto, existen muy pocas literaturas publicadas sobre el impacto que tienen los enjugues bucales sobre el microbioma oral, sobre todo con el empleo de CPC en el

contexto de la pandemia. Por lo cual, se ha requerido la utilización de este colutorio de venta libre por parte de odontólogos y pacientes que buscan una mayor protección y prevención frente a este virus. Ahora, dicho empleo de una manera descontrolada podría tener consecuencias negativas como es el desequilibrio de este microbioma oral, afectando tanto en la salud oral como sistémica como abordan las diferentes investigaciones realizadas por Jia *et al.* (2017)[14], Gao *et al.* (2020)[13], Lee *et al.* (2021)[15], además indicar que no son los únicos factores en esta disbiosis del microbioma oral, pero podrían ser los más relevantes según Brookes *et al.* (2021)[17]. Entonces, dentro de este enfoque metagenómico, como el análisis del gen ARNr 16S, es de suma importancia para llevar a cabo la exploración de los microorganismos ambientales de manera exhaustiva y menos sesgada. Sin embargo, este enfoque solo se ha aplicado en unos pocos estudios que investigan los microbios orales en el contexto de los enjuagues bucales.

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio se evidenció una variación en la diversidad y cantidad de especies bacterianas en el microbioma oral. Después de una semana de uso de CPC, se observó un aumento significativo en el phylum de Proteobacterias, junto con una reducción en la cantidad de Firmicutes y Bacteroidetes. Además, varios géneros bacterianos experimentaron disminuciones, incluyendo *Veillonella*, *Neisseria*, *Prevotella* y *Streptococcus*, mientras que el aumento en *Haemophilus* fue considerablemente mayor.

Estos resultados guardan similitud con lo que Bescos *et al.* (2020)[19] sostienen, ya que después de una semana de uso de CHX, también encontraron un aumento significativo en los phyla de Proteobactearias y Firmicutes, junto con una disminución en la cantidad de Bacteroidetes. Asimismo, experimentaron reducciones en varios géneros bacterianos, como *Prevotella*, *Antinomyces* y *Fusobacterium*, mientras que los géneros *Neisseria*, *Streptococcus* y *Granulicatella* aumentaron.

Sin embargo, estos hallazgos contrastan con los resultados obtenidos por May *et al.* (2018)[22], quienes buscaron determinar las alteraciones en el microbioma esofágico a partir del microbioma oral. En su estudio, antes del uso del enjuague de CHX, el phylum Firmicutes y los géneros *Streptococcus* y *Haemophilus* eran predominantes. Sin embargo, después de dos semanas de uso del colutorio, se presentó un aumento en la especie *Neisseria subflava* y una disminución en los géneros *Streptococcus* y *Haemophilus.*

Un estudio reciente realizado por Liu *et al.* (2023)[16], examinaron los efectos de los enjuagues de CHX y aceites esenciales (Listerine), antes y una semana después de

realizar gárgaras, con el objetivo de comprender si conducían a diferentes disbiosis de las bacterias orales. Encontraron una disminución en los phyla Bacteroidetes, Fusobacteria y Campylobacterota, así como en los géneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* y *Selenomonas* después del uso de CHX. Por otro lado, observaron que *Rothia* aumentó después de usar CHX. Con respecto a Listerine, Firmicutes aumentaron, mientras que Bacteroidetes disminuyeron, y *Parvimonas*, *Eubacterium*, *Selenomonas* y *Tannerella* mostraron una disminución, aunque las magnitudes fueron menores en comparación con el grupo de CHX.

Estos resultados demuestran algunas similitudes y diferencias en relación al presente estudio, debido a que se emplean distintos enjuatorios bucales y la comparación directa de sus efectos no sería adecuada, sin embargo, es relevante considerar su actividad como agentes antimicrobianos. Esto subraya la complejidad de las interacciones entre los enjuagues bucales y el microbioma oral.

Principalmente todos los estudios antes mencionados presentaron alteraciones en el ecosistema oral, lo que implica un desequilibrio en la estructura de la diversidad microbiana en la cavidad bucal. Este fenómeno se debe a que estamos tratando con un sistema extremadamente complejo y heterogéneo que podría reaccionar de manera desfavorable frente a la influencia de factores externos, en particular, los enjuagues bucales específicos. Además, es importante señalar que los estudios previamente descritos se llevaron a cabo con un diseño de tipo ensayo clínico controlado, a diferencia de la presente investigación, que se ha optado por un diseño observacional y descriptivo. En este sentido, es fundamental enfatizar que no se estableció un grupo de control ni se realizaron manipulaciones de variables. En otras palabras, la información se recopiló tal como se encontraba en el protocolo de la clínica odontológica específica, y se registró para su posterior análisis.

Para comprender el impacto fisiológico de los colutorios, es necesario realizar investigaciones adicionales. Sin embargo, su papel funcional puede inferirse a través de los microorganismos "dianas u objetivos" previamente identificados.[16] La cavidad oral sirve como punto de entrada a los sistemas respiratorio y digestivo, y está altamente vascularizada, lo que implica posibles consecuencias del microbioma oral en otras enfermedades sistémicas. De hecho, un creciente número de estudios ha demostrado asociaciones entre otras enfermedades y cambios en el microbioma oral.[14, 15]

En relación a nuestros resultados, una de las especies que mostró un cambio significativo en su abundancia después del uso del enjuague bucal con CPC fue *Haemophilus parainfluenzae*. Sohn *et al.* (2023)[102] sugieren que estas bacterias orales

podrían estar influyendo a través de la colonización intestinal, ya que se ha observado su asociación con la gravedad y progresión de la enfermedad de Crohn, un tipo de enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado, Goh *et al.* (2019)[103] y Pignatelli *et al.* (2020)[104] mencionaron que las bacterias orales reductoras de nitratos son beneficiosas para la salud vascular y están relacionadas con la regulación de la presión arterial y la resistencia a la insulina. Estas bacterias pertenecen al género *Prevotella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Veillonella*, *Antinomyces* y *Corynebactrium*, y se observó una disminución en su presencia en nuestros pacientes después de usar CPC, incluyendo *Prevotella*, *Neisseria* y *Veillonella*. De manera consistente, el uso del enjuague bucal de CPC podría conducir a la inhibición de la conversión de nitrato a nitrito, lo que podría tener un impacto en la salud cardiovascular y endocrina. Además, Rosier *et al.* (2020)[105] indican que la bacteria *Veillonella* tiene la capacidad de reducir el nitrato a nitrito a través de la vía oral del nitrato-nitrito-óxido nítrico, desempeñando un papel fundamental en la regulación del pH oral, manteniéndolo dentro de los niveles fisiológicos normales. Sin embargo, este género bacteriano mostró una reducción después del uso de CPC, lo que podría afectar la salud de los tejidos bucales, tanto duros como blandos, debido al aumento de la acidez en el ecosistema oral. Estos hallazgos son indicativos de un impacto relevante del enjuague bucal de CPC en torno a la comunidad microbiana oral en el ámbito de la salud bucal y sistémica.

En términos generales, se observa una relación coherente con los taxones bacterianos mencionados en los estudios previamente citados, y esto es razonable por varias razones, incluyendo el análisis del microbioma salival, el uso de la técnica 16S y, sobre todo, la inclusión del enjuague bucal con CPC. Adicionalmente, es importante considerar que los posibles cambios en la diversidad y composición de la comunidad microbiana podrían atribuirse al amplio espectro antimicrobiano del CPC, que actúa de manera rápida sobre las bacterias.[89] Así como Pitten *et al.* (2001)[90], sostienen que el CPC ejerce una eliminación de las bacterias de forma no selectiva al alterar la función de la membrana bacteriana, lo que da como resultado una fuga de material citoplasmático y, en última instancia, el colapso del equilibrio intracelular, dando lugar a implicancias tanto positivas como negativas para la salud oral.

Sin embargo, el presente estudio no pretende desestimar el uso de estos colutorios, por el contrario, resalta la necesidad de continuar evaluando su aplicación y llevar a cabo más investigaciones para comprender mejor los impactos y las implicaciones que conlleva, además que es fundamental para desarrollar recomendaciones más precisas sobre su uso en la práctica clínica y sobre todo con el propósito de preservar un microbioma oral saludable.

VII. CONCLUSIONES

- La técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S de longitud completa utilizando la plataforma de nanoporos permitió identificar una amplia variedad de taxones bacterianos en las muestras de saliva. En total, se detectaron 949 OTUs, que se clasificaron en 10 phylum, 239 géneros y 810 especies, según su alineación con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

- La diversidad del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) estuvo conformada principalmente por los phylum Proteobacterias, Firmicutes y Bacteroidetes, junto con diversos géneros como *Haemophilus, Veillonella, Neisseria, Streptococcus, Prevotella*. Asimismo, se identificaron especies como *Haemophilus parainfluenzae, Neisseria perflava, Veillonella parvula, Veillonella dispar, Prevotella melaninogenica y Streptococcus toyakuensis.*

- La comparación de la diversidad y abundancia del microbioma oral antes (A) y una semana después (D) del uso de CPC, reveló una notable variación de la composición bacteriana encontrada en los phylum: Proteobacterias (A: 62,41% - D: 90,05%), Firmicutes (A: 28,54% - D: 8,16), Bacteroidetes (A: 5,11% - D: 0,72%). En cuanto a género: *Haemophilus* (A: 43,39% - D: 72,10%), *Veillonella* (A: 15,94% - D: 4,35%), *Neisseria* (A: 7,48% - D: 4,53), *Streptococcus* (A: 7,38% - D: 1,87%), *Prevotella* (A: 2,65% - D: 0,34%). De igual forma, en el caso de las especies: *Haemophilus parainfluenzae* (A: 33,78% - D: 63,97%), *Neisseria perflava* (A: 5,28% - D: 2,57%), *Veillonella parvula* (A: 4,56% - D: 0,94%), *Veillonella dispar* (A: 4,05% - D: 1,09%), *Prevotella melaninogenica (*A: 1,40% - D: 0,12%), *Streptococcus toyakuensis (*A: 1,64% - D: 0,22%).

- En definitiva, el análisis taxonómico del microbioma oral reveló de manera concluyente la marcada influencia del enjuague bucal a base de CPC. Este notable impacto se manifiesta a través de los cambios significativos en la composición del microbioma oral como resultado del uso de este colutorio.

VIII. RECOMENDACIONES

- Fomentar la adopción de tecnologías emergentes, como las técnicas moleculares basadas en el gen ARNr 16S con la plataforma Oxford Nanopore Technologies, para obtener un análisis más detallado y preciso de la composición taxonómica del microbioma oral.
- Se sugiere realizar ensayos clínicos controlados para una evaluación más rigurosa de los efectos del enjuague bucal de CPC en la salud oral. Estos estudios pueden proporcionar evidencia sólida que orientará a profesionales de la salud y pacientes en la elección de productos para el cuidado bucal.
- Realizar más investigaciones para expandir nuestro entendimiento limitado sobre la disbiosis en la composición microbiana, especialmente desde el punto de vista de la metagenómica. Esto permitirá seguir determinando si el enjuague bucal de CPC impacta de manera positiva o negativa en las bacterias del microbioma oral, y cómo estos efectos se relacionan con la salud oral y sistémica.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Madupu R, Szpakowski S, Nelson KE. Microbiome in human health and disease. Sci Prog. 2013;96(2):153–70. Disponible en: http://doi.org/10.3184/003685013x13683759820813

2. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012;486(7402):207–14. Disponible en: http://doi.org/10.1038/nature11234

3. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. Clin Exp Immunol. 2018;195(1):74–85. Disponible en: http://doi.org/10.1111/cei.13158

4. Michaud DS, Joshipura K, Giovannucci E, Fuchs CS. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. J Natl Cancer Inst. 2007;99(2):171–5. Disponible en: http://doi.org/10.1093/jnci/djk021

5. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006;444(7122):1022–3. Disponible en: http://doi.org/10.1038/4441022a

6. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration: Microbiota-gut-brain axis across the lifespan. J Physiol. 2017;595(2):489–503. Disponible en: http://doi.org/10.1113/jp273106

7. Green A, Roberts G, Tobery T, Vincent C, Barili M, Jones C. *In vitro*assessment of the virucidal activity of four mouthwashes containing Cetylpyridinium Chloride, ethanol, zinc and a mix of enzyme and proteins against a human coronavirus. bioRxiv. 2020. Disponible en: http://doi.org/10.1101/2020.10.28.359257

8. Muñoz-Basagoiti J, Perez-Zsolt D, León R, Blanc V, Raïch-Regué D, Cano-Sarabia M, et al. Cetylpyridinium chloride-containing mouthwashes reduce the infectivity of SARS-CoV-2 variants *in vitro*. bioRxiv. 2020. Disponible en: http://doi.org/10.1101/2020.12.21.423779

9. Uribe Vélez D. Metagenómica. ¿Una oportunidad para el estudio de la diversidad microbiana en Colombia? Rev Colomb Biotecnol. 2009;11(2):4–7. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77613172001

10. Suárez Moya A. Microbioma y secuenciación masiva. Rev esp quimioter. 2017;305–11. Disponible en: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-167146

11. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the oral microbiome: Beyond bacteria. Trends Microbiol. 2017;25(5):362–74. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.012

12. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiol. 2018;200(4):525–40. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3

13. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. Protein Cell. 2018;9(5):488–500. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s13238-018-0548-1

14. Jia G, Zhi A, Lai PFH, Wang G, Xia Y, Xiong Z, et al. The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. Br Dent J. 2018;224(6):447–55. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.217

15. Lee YH, Chung SW, Auh QS, Hong SJ, Lee YA, Jung J, et al. Progress in oral microbiome related to oral and systemic diseases: An update. Diagnostics (Basel). 2021;11(7):1283. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11071283

16. Liu T, Chen YC, Jeng SL, Chang JJ, Wang JY, Lin CH, et al. Short-term effects of Chlorhexidine mouthwash and Listerine on oral microbiome in hospitalized patients. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1056534. Disponible en: http://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1056534

17. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ, et al. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. J Dent. 2021;113(103768):103768. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103768

18. Verma D, Srivastava A, Garg PK, Akhter Y, Dubey AK, Mishra S, et al. Taxonomic profiling and functional characterization of the healthy human oral bacterial microbiome from the north Indian urban sub-population. Arch Microbiol. 2021;203(3):927–39. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s00203-020-02084-7

19. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, et al. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. Sci Rep. 2020;10(1):5254. Disponible en: http://doi.org/10.1038/s41598-020-61912-4

20. Omori M, Kato-Kogoe N, Sakaguchi S, Fukui N, Yamamoto K, Nakajima Y, et al. Comparative evaluation of microbial profiles of oral samples obtained at different collection time points and using different methods. Clin Oral Investig. 2021;25(5):2779–89. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s00784-020-03592-y

21. Ashworth A, Easton C, Liddle L, Hickson M, Moore M, Bescos R. The effects of antibacterial mouthwash on the oral microbiome: potential consequences for intensive care patients. Clin Nutr ESPEN. 2019;29:255–6. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.12.022

22. May M, Annavajhala MK, Compres G, Freedberg DE, Graham R, Uhlemann A-C, et al. Mo1941 - A randomized controlled trial to assess the effects of an antimicrobial mouthwash on the oral and esophageal microbiome. Gastroenterology. 2018;154(6):S-859. Disponible en: http://doi.org/10.1016/s0016-5085(18)32905-6

23. Gilbert JA, Dupont CL. Microbial metagenomics: Beyond the genome. Ann Rev Mar Sci. 2011;3(1):347–71. Disponible en: http://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811

24. Wilson MC, Piel J. Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. Chem Biol. 2013;20(5):636–47. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.011

25. Cueto M, De La Fuente N, Luévanos M. Fronteras en Microbiología Aplicada. Uadec.mx. 2014. Disponible en: http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/site/wp-content/uploads/2020/10/3.-2014Fronteras-en-microbiologia.pdf

26. Desai N, Antonopoulos D, Gilbert JA, Glass EM, Meyer F. From genomics to metagenomics. Curr Opin Biotechnol. 2012;23(1):72–6. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.017

27. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nat Biotechnol. 2017;35(9):833–44. Disponible en: http://doi.org/10.1038/nbt.3935

28. Deiner K, Bik HM, Mächler E, Seymour M, Lacoursière-Roussel A, Altermatt F, et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Mol Ecol. 2017;26(21):5872–95. Disponible en: http://doi.org/10.1111/mec.14350

29. Zhan A, Hulák M, Sylvester F, Huang X, Adebayo AA, Abbott CL, et al. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities. Methods Ecol Evol. 2013;4(6):558–65. Disponible en: http://doi.org/10.1111/2041-210x.12037

30. Sjöling S, Cowan DA. Metagenomics: Microbial community genomes revealed. En: Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 313–32. Disponible en: http://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4_18

31. Dhaliwal A. DNA extraction and purification. Mater Meth. 2013;3:191. Disponible en: http://doi.org/10.13070/mm.en.3.191

32. Tamay DL, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad. 2013;2(2):70-78. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf

33. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol. 2007;45(9):2761–4. Disponible en: http://doi.org/10.1128/jcm.01228-07

34. Zaura E, Keijser BJF, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. BMC Microbiol. 2009;9(1):259. Disponible en: http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259

35. Xiao T, Zhou W. The third generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. Transl Pediatr. 2020;9(2):163–73. Disponible en: http://doi.org/10.21037/tp.2020.03.06

36. Kono N, Arakawa K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. Dev Growth Differ. 2019;61(5):316–26. Disponible en: http://doi.org/10.1111/dgd.12608

37. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 2011;12(6):R60. Disponible en: http://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60

38. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. Genome Biol. 2010;11(5):207. Disponible en: http://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-207

39. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4516–22. Disponible en: http://doi.org/10.1073/pnas.1000080107

40. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine: The oral microbiome. Oral Dis. 2012;18(2):109–20. Disponible en: http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x

41. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The oral Microbiota: Living with a permanent guest. DNA Cell Biol. 2009;28(8):405–11. Disponible en: http://doi.org/10.1089/dna.2009.0874

42. Marsh PD, Percival RS. The oral microflora-friend or foe? Can we decide? Int Dent J. 2006;56(4 Suppl 1):233–9. Disponible en: http://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2006.tb00107.x

43. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. Altern Med Rev. 2004;9(2):180–97. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15253677/

44. Olesen SW, Alm EJ. Dysbiosis is not an answer. Nat Microbiol. 2016;1(12):16228. Disponible en: http://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.228

45. Pulikkan J, Mazumder A, Grace T. Role of the gut microbiome in autism spectrum disorders. Adv Exp Med Biol. 2019;1118:253–69. Disponible en: http://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4_13

46. Scott AJ, Alexander JL, Merrifield CA, Cunningham D, Jobin C, Brown R, et al. International Cancer Microbiome Consortium consensus statement on the role of the human microbiome in carcinogenesis. Gut. 2019;68(9):1624–32. Disponible en: http://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318556

47. Jiang Q, Liu J, Chen L, Gan N, Yang D. The oral microbiome in the elderly with dental caries and health. Front Cell Infect Microbiol. 2019;8:442. Disponible en: http://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00442

48. Ganji KK, Tantry BA. Prevalence and molecular analysis of novel newly identified periodontal pathogens in subgingival plaque samples of Saudi patients with chronic periodontitis. Pesqui bras odontopediatria clín integr. 2019;19(1):4679. Disponible en: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-998236

49. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. Br Dent J. 2016;221(10):657–66. Disponible en: http://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865

50. Duran-Pinedo AE, Frias-Lopez J. Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. Microbes Infect. 2015;17(7):505–16. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.014

51. Lundmark A, Hu YOO, Huss M, Johannsen G, Andersson AF, Yucel-Lindberg T. Identification of salivary Microbiota and its association with host inflammatory mediators in periodontitis. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:216. Disponible en: http://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00216

52. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. Protein Cell. 2018;9(5):488–500. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s13238-018-0548-1

53. Bewley AF, Farwell DG. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. Clin Dermatol. 2017;35(5):461–7. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.06.008

54. Reichart PA, Schmidt-Westhausen AM, Khongkhunthian P, Strietzel FP. Dental implants in patients with oral mucosal diseases - a systematic review. J Oral Rehabil. 2016;43(5):388–99. Disponible en: http://doi.org/10.1111/joor.12373

55. Yeoh S-A, Dias SS, Isenberg DA. Advances in systemic lupus erythematosus. Medicine. 2018;46(2):84–92. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.11.010

56. Amer A, Galvin S, Healy CM, Moran GP. The Microbiome of Potentially Malignant Oral Leukoplakia Exhibits Enrichment for Fusobacterium, Leptotrichia, Campylobacter, and Rothia Species. Front Microbiol. 2017;8:2391. Disponible en: http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02391

57. Hu X, Zhang Q, Hua H, Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. Oral Oncol. 2016;56:e6–8. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.03.007

58. Werning JW. Oral Cancer: Diagnosis, Management, and Rehabilitation. Werning J, editor. New York: Thieme; 2007. Disponible en: http://doi.org/10.1055/b-002-85470

59. Gholizadeh P, Eslami H, Yousefi M, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Kafil HS. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. Biomed Pharmacother. 2016;84:552–8. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.082

60. Yu G, Gail MH, Shi J, Klepac-Ceraj V, Paster BJ, Dye BA, et al. Association between upper digestive tract Microbiota and cancer-predisposing states in the esophagus and stomach. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(5):735–41. Disponible en: http://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-13-0855

61. Groeger S, Jarzina F, Domann E, Meyle J. Porphyromonas gingivalis activates NFκB and MAPK pathways in human oral epithelial cells. BMC Immunol. 2017;18(1):1. Disponible en: http://doi.org/10.1186/s12865-016-0185-5

62. Cruz GA da, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GMB, de Cássia Orlandi Sardi J, et al. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. J Periodontol. 2008;79(7):1150–7. Disponible en: http://doi.org/10.1902/jop.2008.070503

63. Ganesan SM, Joshi V, Fellows M, Dabdoub SM, Nagaraja HN, O'Donnell B, et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. ISME J. 2017;11(9):2075–89. Disponible en: http://doi.org/10.1038/ismej.2017.73

64. Casarin RCV, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2013;48(1):30–6. Disponible en: http://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x

65. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4592–8. Disponible en: http://doi.org/10.1073/pnas.1011383107

66. Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutiérrez JM, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. J Periodontol. 2011;82(10):1469–77. Disponible en: http://doi.org/10.1902/jop.2011.100719

67. Armingohar Z, Jørgensen JJ, Kristoffersen AK, Abesha-Belay E, Olsen I. Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. J Oral Microbiol. 2014;6(1):23408. Disponible en: http://doi.org/10.3402/jom.v6.23408

68. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2011;474(7351):307–17. Disponible en: http://doi.org/10.1038/nature10209

69. Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary Microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. DNA Res. 2014;21(1):15–25. Disponible en: http://doi.org/10.1093/dnares/dst037

70. Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T H 1 cell induction and inflammation. Science. 2017;358(6361):359–65. Disponible en: http://doi.org/10.1126/science.aan4526

71. Peters BA, Wu J, Pei Z, Yang L, Purdue MP, Freedman ND, et al. Oral microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers. Cancer Res. 2017;77(23):6777–87. Disponible en: http://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-1296

72. Morita E, Narikiyo M, Yano A, Nishimura E, Igaki H, Sasaki H, et al. Different frequencies of Streptococcus anginosus infection in oral cancer and esophageal cancer. Cancer Sci. 2003;94(6):492–6. Disponible en: http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01471.x

73. Yamamura K, Baba Y, Nakagawa S, Mima K, Miyake K, Nakamura K, et al. Human microbiome Fusobacterium nucleatum in esophageal cancer tissue is associated with prognosis. Clin Cancer Res. 2016;22(22):5574–81. Disponible en: http://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-1786

74. Flemer B, Warren RD, Barrett MP, Cisek K, Das A, Jeffery IB, et al. The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. Gut. 2018;67(8):1454–63. Disponible en: http://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314814

75. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 2012;22(2):299–306. Disponible en: http://doi.org/10.1101/gr.126516.111

76. Drewes JL, White JR, Dejea CM, Fathi P, Iyadorai T, Vadivelu J, et al. High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia. NPJ Biofilms Microbiomes. 2017;3:34. Disponible en: http://doi.org/10.1038/s41522-017-0040-3

77. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement. 2016;12(4):459–509. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001

78. Liccardo D, Marzano F, Carraturo F, Guida M, Femminella GD, Bencivenga L, et al. Potential bidirectional relationship between periodontitis and Alzheimer's disease. Front Physiol. 2020;11:683. Disponible en: http://doi.org/10.3389/fphys.2020.00683

79. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. Sci Adv. 2019;5(1). Disponible en: http://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333

80. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest. 1998;101(1):273–81. Disponible en: http://doi.org/10.1172/jci1316

81. Mikuls TR, Thiele GM, Deane KD, Payne JB, O'Dell JR, Yu F, et al. Porphyromonas gingivalisand disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2012;64(11):3522–30. Disponible en: http://doi.org/10.1002/art.34595

82. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans–induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. Sci Transl Med. 2016;8(369). Disponible en: http://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj1921

83. Chen B, Zhao Y, Li S, Yang L, Wang H, Wang T, et al. Variations in oral microbiome profiles in rheumatoid arthritis and osteoarthritis with potential biomarkers for arthritis screening. Sci Rep. 2018;8(1):17126. Disponible en: http://doi.org/10.1038/s41598-018-35473-6

84. Brito-Zerón P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette X, et al. Sjögren syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2016;2(1):16047. Disponible en: http://doi.org/10.1038/nrdp.2016.47

85. van der Meulen TA, Harmsen HJM, Bootsma H, Liefers SC, Vich Vila A, Zhernakova A, et al. Dysbiosis of the buccal mucosa microbiome in primary Sjögren's syndrome patients. Rheumatology (Oxford). 2018;57(12):2225–34. Disponible en: http://doi.org/10.1093/rheumatology/key215

86. de Paiva CS, Jones DB, Stern ME, Bian F, Moore QL, Corbiere S, et al. Altered mucosal microbiome diversity and disease severity in Sjögren syndrome. Sci Rep. 2016;6(1):23561. Disponible en: http://doi.org/10.1038/srep23561

87. Li M, Zou Y, Jiang Q, Jiang L, Yu Q, Ding X, et al. A preliminary study of the oral microbiota in Chinese patients with Sjögren's syndrome. Arch Oral Biol. 2016;70:143–8. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.06.016

88. Suárez L, Martínez M, Arce R, Rodríguez A. Antisépticos orales para la disminución del riesgo de transmisión del COVID-19. Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2020. Disponible en: http://doi.org/10.11144/javeriana.9789587815382

89. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. Lett Appl Microbiol. 2013; 56(1):14–20. https://doi.org/10.1111/lam.12008

90. Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. Arzneimittelforschung. 2001;51(7):588–95. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1300084

91. Sundheim G, Langsrud S, Heir E, Holck AL. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. Int Biodeterior Biodegradation. 1998;41(3–4):235–9. Disponible en: http://doi.org/10.1016/s0964-8305(98)00027-4

92. Beiswanger BB, Mallatt ME, Mau MS, Jackson RD, Hennon DK. The clinical effects of a mouthrinse containing 0.1% octenidine. J Dent Res. 1990;69(2):454–7. Disponible en: http://doi.org/10.1177/00220345900690020701

93. Stookey GK, Beiswanger B, Mau M, Isaacs RL, Witt JJ, Gibb R. A 6-month clinical study assessing the safety and efficacy of two cetylpyridinium chloride mouthrinses. Am J Dent. 2005;18 Spec No:24A:28A. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16178133

94. Lobene RR, Kashket S, Soparkar PM, Shloss J, Sabine ZM. The effect of cetylpridinium chloride on human plaque bacteria and gingivitis. Pharmacol Ther Dent. 1979;4(1):33–47. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/295121

95. Sigua-Rodríguez EA, Bernal-Pérez JL, Lanata-Flores AG, Sánchez-Romero C, Rodríguez-Chessa J, Haidar ZS, et al. COVID-19 y la Odontología: una Revisión de las Recomendaciones y Perspectivas para Latinoamérica. Int J Odontostomatol. 2020;14(3):299–309. Disponible en: http://doi.org/10.4067/s0718-381x2020000300299

96. Popkin DL, Zilka S, Dimaano M, Fujioka H, Rackley C, Salata R, et al. Cetylpyridinium chloride (CPC) exhibits potent, rapid activity against influenza viruses in vitro and in vivo. Pathog Immun. 2017;2(2):252–69. Disponible en: http://doi.org/10.20411/pai.v2i2.200

97. Yoon JG, Yoon J, Song JY, Yoon S-Y, Lim CS, Seong H, et al. Clinical significance of a high SARS-CoV-2 viral load in the saliva. J Korean Med Sci. 2020;35(20):e195. Disponible en: http://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e195

98. Eduardo F de P, Corrêa L, Heller D, Daep CA, Benitez C, Malheiros Z, et al. Salivary SARS-CoV-2 load reduction with mouthwash use: A randomized pilot clinical trial. Heliyon. 2021;7(6):e07346. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07346

99. Millones-Gómez PA. Mouthwashes in COVID-19: Benefit or harm to the oral microbiome? Oral Dis. 2022;28(S2):2608–9. Disponible en: http://doi.org/10.1111/odi.13975

100. Jo R, Nishimoto Y, Umezawa K, Yama K, Aita Y, Ichiba Y, et al. Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water. Sci Rep. 2019;9(1):16124. Disponible en: http://doi.org/10.1038/s41598-019-52445-6

101. Fan X, Peters BA, Min D, Ahn J, Hayes RB. Comparison of the oral microbiome in mouthwash and whole saliva samples. PLoS One. 2018;13(4):e0194729. Disponible en: http://doi.org/10.1371/journal.pone.0194729

102. Sohn J, Li L, Zhang L, Genco RJ, Falkner KL, Tettelin H, et al. Periodontal disease is associated with increased gut colonization of pathogenic Haemophilus parainfluenzae in patients with Crohn's disease. Cell Rep. 2023;42(2):112120. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112120

103. Goh CE, Trinh P, Colombo PC, Genkinger JM, Mathema B, Uhlemann A-C, et al. Association between nitrate-reducing oral bacteria and cardiometabolic outcomes: Results from ORIGINS. J Am Heart Assoc. 2019;8(23):e013324. Disponible en: http://doi.org/10.1161/jaha.119.013324

104. Pignatelli P, Fabietti G, Ricci A, Piattelli A, Curia MC. How periodontal disease and presence of nitric oxide reducing oral bacteria can affect blood pressure. Int J Mol Sci. 2020;21(20):7538. Disponible en: http://doi.org/10.3390/ijms21207538

105. Rosier BT, Buetas E, Moya-Gonzalvez EM, Artacho A, Mira A. Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. Sci Rep. 2020;10(1). Disponible en: http://doi.org/10.1038/s41598-020-69931-x

X. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de uso del enjuague bucal de Cloruro de Cetilpiridinio (CPC) de la Clínica Odontológica Privada

Clínica Dental CAPOdent

PROTOCOLO DE PREVENCIÓN

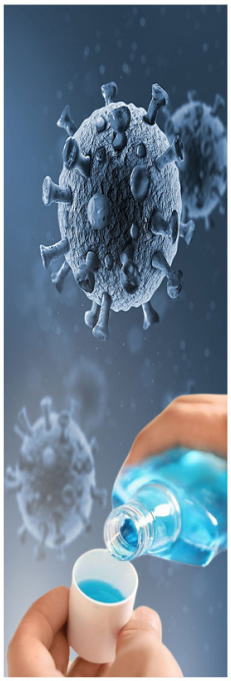
- El enjuague bucal de cloruro de cetilpiridinio (CPC), inactiva las espículas responsables de la infección del virus SARS-CoV-2 (COVID-19), es decir, degrada la membrana lipídica que recubre el virus provocando su inactivación, y de esta manera evita que pueda adherirse a los receptores presentes en la cavidad oral.
- Múltiples investigaciones realizadas a partir de muestras de saliva de personas infectadas que fueron atendidas en centros de atención primaria, confirman la capacidad del CPC para romper la membrana del virus. Por lo tanto como odontólogos recomendamos el uso de este enjuague bucal con la finalidad de estar protegidos y prevenir el riesgo de contagios asimismo asegurar que ambas partes, profesional y paciente, utilicen todas las barreras posibles. A continuación detallamos para un óptimo empleo de este colutorio.

Indicaciones para el uso del enjuague bucal de CPC:

- ✓ Pacientes que buscan una mayor protección bucal activa para una óptima salud.
- ✓ Pacientes que buscan, en un cuidado diario, una protección extra.

Modo de empleo del enjuague bucal de CPC:

- ✓ Realizar enjuagues y hacer gargarismos para llegar a las zonas más lejanas de la cavidad bucal, con 15 ml de colutorio de CPC 0,07%, durante un minuto, dos veces al día, por la mañana y por la noche, después del cepillado, por 7 días.
- ✓ **OJO**: El uso de los enjuagues bucales no debería durar más de 10-15 días.



Tarrago-Gil, R., Gil-Mosteo, et al. Randomized clinical trial to assess the impact of oral intervention with cetylpyridinium chloride to reduce salivary SARS-CoV-2 viral load. Journal of Clinical Periodontology. 2023; 50(3), 288–294. https://doi.org/10.1111/jcpe.13746

Anexo 2

Ficha de Recolección de Datos

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Facultad de Odontología

"Análisis del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) mediante la técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S"

Ficha de Registro de Datos N°..... Fecha: ..... / ..... / 202...

DATOS GENERALES:

- Paciente (Apellidos y Nombres): ……
- Edad: …… años - Sexo: M ( ), F ( )
- Dirección: ……
- Celular: ……

ANTECEDENTES:

- ¿Tiene alguna enfermedad actualmente? SI ( ), NO ( )
- ¿Toma algún medicamento? SI ( ), NO ( )
- ¿Ud. Fuma? SI ( ), NO ( )
- ¿Usa brackets o prótesis removible? SI ( ), NO ( )

EVALUACIÓN CLÍNICA:

- ✓ Salud gingival: SI ( ), NO ( )
- ✓ Salud periodontal: SI ( ), NO ( )
- ✓ Presencia de caries dental activa: SI ( ), NO ( )
- ✓ Índice de Higiene Oral (%): ……

Anexo 3

Consentimiento Informado para la participación de los pacientes en la investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo……, con DNI N°……. dejo constancia que se me ha explicado en que consiste la investigación titulada “Análisis del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) mediante la técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S”, realizada por el estudiante Segura Rojas Jhovany Ernesto.

Además, tengo conocimiento de los beneficios que traerá esta investigación como el aporte de evidencia científica para futuros estudios y un conocimiento más fiable acerca de la composición de los microorganismos bacterianos presentes en ambas muestras (antes y una semana después), a fin de contribuir en el estado de su salud oral y sistémica. Asimismo, estoy informado de los riesgos que no se prevén por participar en esta investigación, debido a que la toma de muestra de saliva no es dolorosa y no existe un riesgo invasivo. Me han informado que no recibiré ningún estipendio por participar. También sé cuáles son los criterios de selección de los pacientes para ser parte de esta investigación.

He tenido el tiempo y la oportunidad de realizar las preguntas con relación al tema, las cuales fueron respondidas de forma clara por el investigador. Sé que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme en cualquier momento, sin perjuicio alguno. Así mismo tengo conocimiento que los datos que se obtengan se manejarán confidencialmente.

Por todo lo anterior doy mi consentimiento voluntario para participar en el presente estudio.

_____

Firma del paciente
DNI:

_____

Firma del informante
DNI:

Fecha:……

Estimado participante:

Soy el estudiante Segura Rojas Jhovany Ernesto de la Facultad de Odontologpia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, responsable de la investigación titulada: “Análisis del microbioma oral en pacientes sanos usuarios de cloruro de cetilpiridinio (CPC) mediante la técnica de secuenciación *metabarcoding* del gen ARNr 16S”

El presente documento es para invitarle a ser parte del estudio, el cual tiene como objetivo analizar los taxones bacterianos presentes en el microbioma oral, es decir, identificar la diversidad y cantidad de especies bacterianas en pacientes sanos, antes y una semana después de haber utilizado este enjuague bucal de CPC empleando técnicas moleculares que permiten determinar dicha comunidad de microorganismos.

La información que Ud. brinde al estudio será de uso exclusivo del investigador y se mantendrá su debida confidencialidad.

Su participación es voluntaria, puede decidir no ser parte de la investigación sin que este afecte de alguna forma. Por participar del estudio Ud. no recibirá ningún beneficio, pero sí la satisfacción de contribuir en esta importante investigación.

ACEPTO ☐ NO ACEPTO ☐

Anexo 4

Procesamiento de las muestras

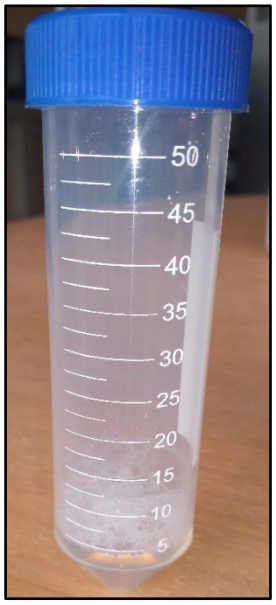


Figura 9. Muestra de saliva no estimulada de aproximadamente 3 mL.



A

Figura 10. Extracción de ADN. **A.** Kit comercial Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, EE. UU).



B

Figura 11. Extracción de ADN. **B.** Tubo de microcentrífuga estéril con el contenido del ADN extraído.

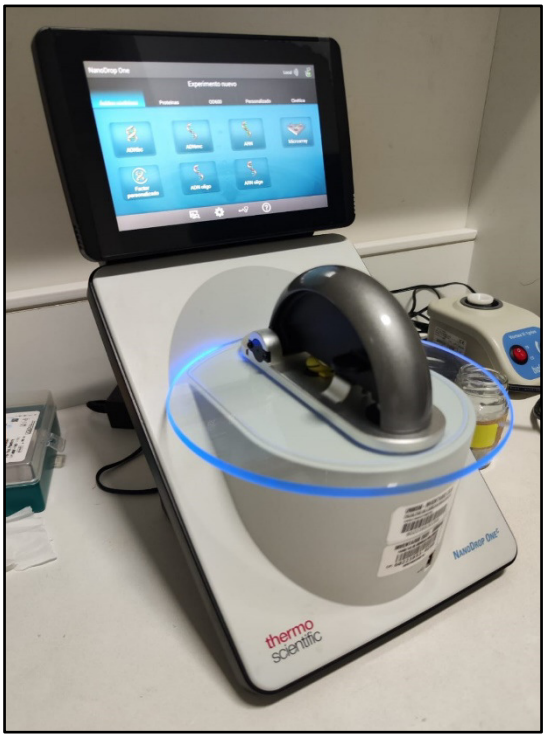


Figura 12. Cuantificación de la calidad y concentración del ADN extraído mediante Nanodrop™ One C (Thermo Scientific, EE. UU).

Anexo 5

Preparación de la librería molecular (*metabarcoding*)

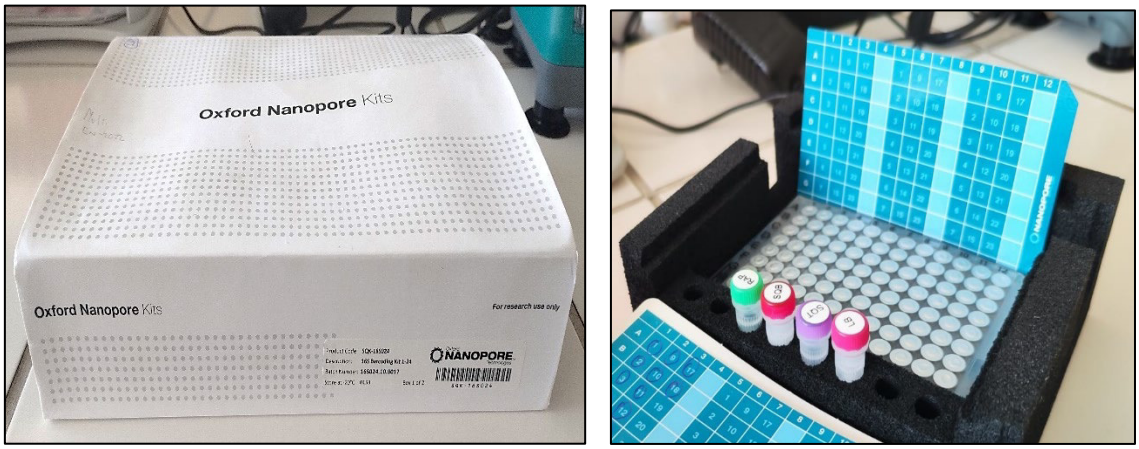
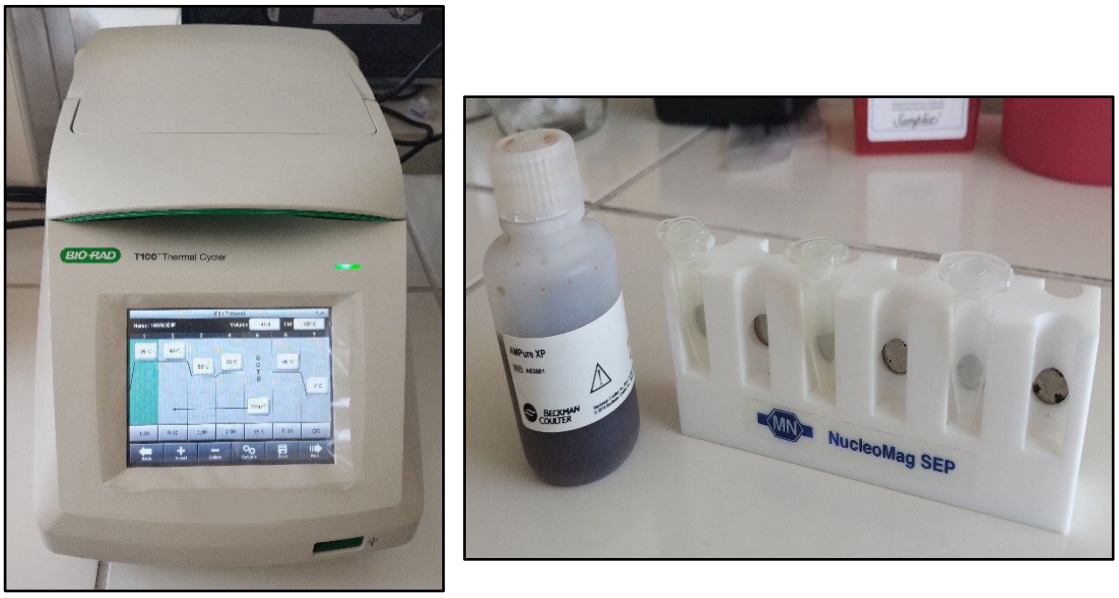


Figura 13. Kit 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024, Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido).



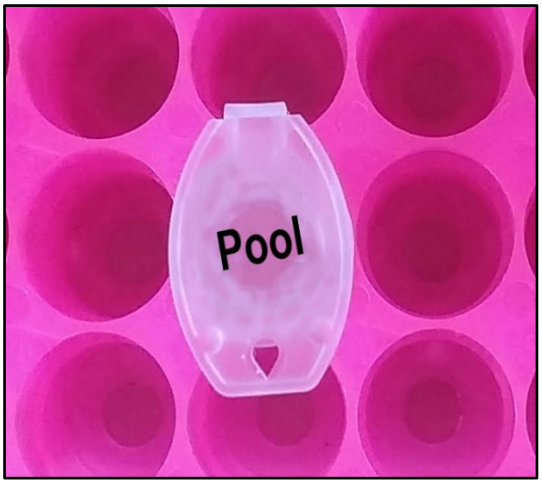
A **B**

Figura 14. Preparación de librerías **A.** Amplificación del gen ARNr 16S de longitud completa. **B.** Purificación con perlas magnéticas AMPure XP.



C

Figura 15. Preparación de librerías **C.** Agregado de los barcoding o códigos de barra a cada muestra.





D **E**

Figura 16. Preparación de librerías **D.** Combinación de las 24 muestras (Pool de barcodes) **E.** Adición del adaptador RAP, para permitir la interacción del ADN con el poro y su posterior secuenciamiento.

Anexo 6

Secuenciamiento con la plataforma de Nanoporos



Figura 17. Equipo de secuenciamiento portátil MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido).

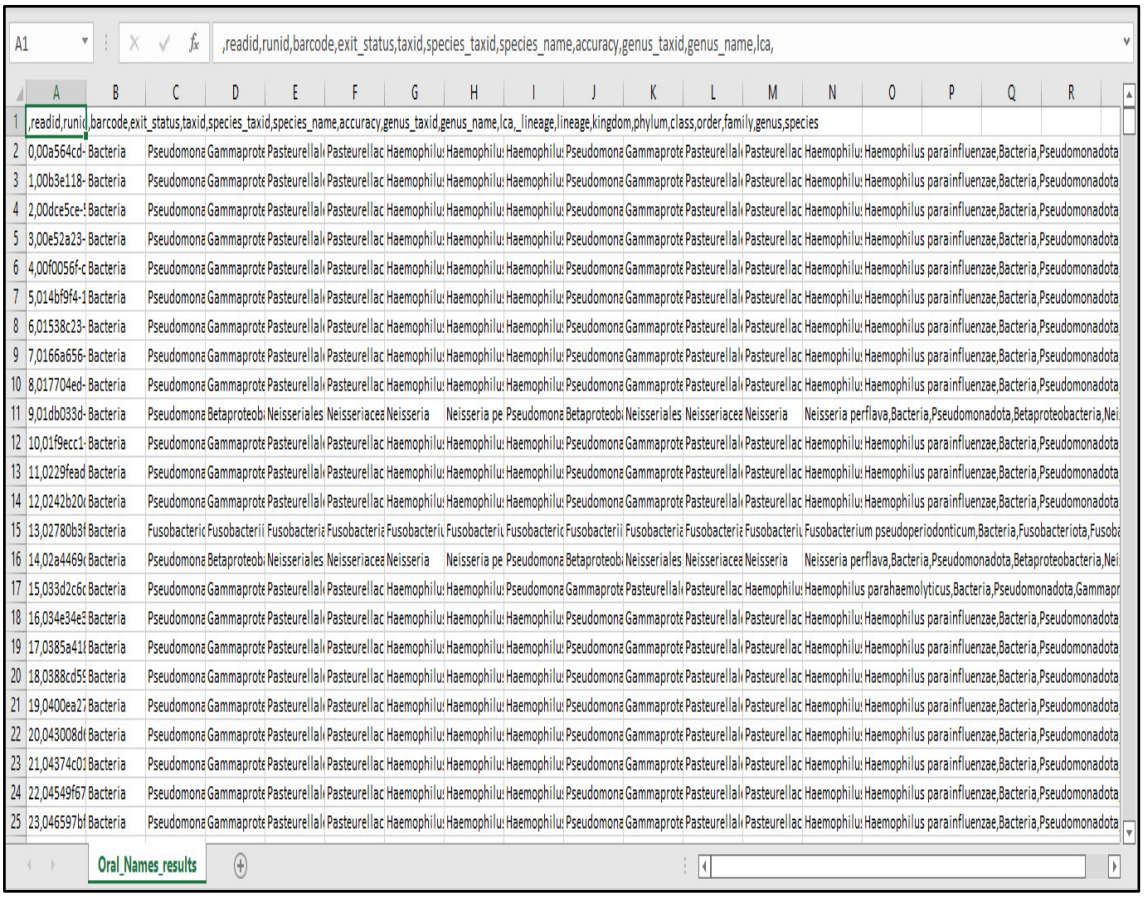


A **B** **C**

Figura 18. Activación y cargado de celda de flujo. **A.** Verificación de la celda flujo Flongle FLO-FLG001(Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). **B.** Cargado de la muestra en la celda de flujo **C.** Inicio del secuenciamiento.

Anexo 7

Resultados de las lecturas de OTUs posterior a la comparación y alineamiento por BLAST



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	,readid,runid	barcode,exit_status,taxid	species_taxid	species_name	accuracy	genus_taxid	genus_name	lca,	lineage	lineage	kingdom	phylum	class	order	family	genus	species	
2	0,00a564cd-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota
3	1,00b3e118-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
4	2,00dce5ce-5	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
5	3,00e52a23-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
6	4,00f0056f-c	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
7	5,014bf9f4-1	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
8	6,01538c23-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
9	7,0166a656-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
10	8,017704ed-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
11	9,01db033d-	Bacteria	Pseudomona	Betaproteob	Neisseriales	Neisseriacea	Neisseria	Neisseria pe	Pseudomona	Betaproteob	Neisseriales	Neisseriacea	Neisseria	Neisseria perflava	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Nei
12	10,01f9ecc1-	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
13	11,0229fead	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
14	12,0242b20(	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
15	13,02780b3f	Bacteria	Fusobacteri	Fusobacteri	Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteri	Fusobacteri	Fusobacteri	Fusobacteri	Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteri	Fusobacterium pseudoperiodonticum	Bacteria	Fusobacteriota	Fusoba	
16	14,02a4469(	Bacteria	Pseudomona	Betaproteob	Neisseriales	Neisseriacea	Neisseria	Neisseria pe	Pseudomona	Betaproteob	Neisseriales	Neisseriacea	Neisseria	Neisseria perflava	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Nei
17	15,033d2c6c	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parahaemolyticus	Bacteria	Pseudomonadota	Gammapr
18	16,034e34e3	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
19	17,0385a41(	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
20	18,0388cd5(	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
21	19,0400ea27	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
22	20,043008d(	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
23	21,04374c01	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
24	22,04549f67	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	
25	23,046597bf	Bacteria	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilu	Haemophilu	Pseudomona	Gammaprote	Pasteurella	Pasteurellac	Haemophilu	Haemophilus parainfluenzae	Bacteria	Pseudomonadota	

Figura 19. Utilización del identificador del NCBI Taxonomy (TAXID) para identificar a los grupos taxonómicos.

Anexo 8

Tablas de Clasificación Taxonómicas

tax_table_oral

Archivo Editar Ver Insertar Formato Datos Herramientas Extensiones Ayuda

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	taxid	kingdom	phylum	class	order	family	genus	species	
2	158	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Treponemataceae	Treponema	Treponema denticola	
3	163	Bacteria	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Treponemataceae	Treponema	Treponema bryantii	
4	195	Bacteria	Campylobacterota	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter coli	
5	199	Bacteria	Campylobacterota	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter concisus	
6	200	Bacteria	Campylobacterota	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter curvus	
7	202	Bacteria	Campylobacterota	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter mucosalis	
8	203	Bacteria	Campylobacterota	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter rectus	
9	204	Bacteria	Campylobacterota	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter	Campylobacter showae	
10	238	Bacteria	Bacteroidota	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Elizabethkingia	Elizabethkingia meningoseptica	
11	246	Bacteria	Bacteroidota	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	Chryseobacterium	Chryseobacterium balustinum	
12	287	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas aeruginosa	
13	294	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens	
14	468	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Moraxellales	Moraxellaceae			
15	476	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Moraxellales	Moraxellaceae	Moraxella	Moraxella bovis	
16	477	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Moraxellales	Moraxellaceae	Moraxella	Moraxella lacunata	
17	480	Bacteria	Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Moraxellales	Moraxellaceae	Moraxella	Moraxella catarrhalis	
18	481	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae			
19	483	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria cinerea	
20	484	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria flavescens	
21	485	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria gonorrhoeae	
22	487	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria meningitidis	
23	488	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria mucosa	
24	489	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria polysaccharea	
25	492	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria animalis	
26	493	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria canis	
27	496	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	Neisseria macacae	
28	536	Bacteria	Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Chromobacteriaceae	Chromobacterium	Chromobacterium violaceum	

tax_table_oral

Figura 20. Tabla taxonómica de OTUs.

tax_count_oral

Archivo Editar Ver Insertar Formato Datos Herramientas Extensiones Ayuda

Compartir

	A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	D1	D2	D3	D4	D5
1																		
2	2	19	7	52	35	7	41	17	34	33	10	48	27	20	14	6	19	
3	158	0	14	0	4	0	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0	
4	163	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
5	195	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	1	0	0	4	
6	199	298	70	12	38	128	158	75	26	84	477	189	28	165	10	8	18	
7	200	2	3	0	1	1	0	1	0	2	2	4	1	0	0	0	0	
8	202	0	0	0	1	2	0	12	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
9	203	4	23	0	4	1	2	28	0	9	68	0	9	0	6	2	0	
10	204	0	9	9	6	2	35	10	3	39	0	16	8	0	0	2	16	
11	238	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	246	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	287	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	294	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
16	476	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
17	477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
18	480	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
19	481	10	92	102	176	17	15	39	72	7	78	13	35	22	31	16	35	
20	483	0	3	6	34	2	8	8	19	0	5	5	6	0	4	0	10	
21	484	0	0	0	13	2	1	0	2	0	4	1	5	0	1	0	2	
22	485	0	0	4	11	0	0	1	4	0	0	2	0	0	4	0	2	
23	487	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	
24	488	6	5	51	34	21	0	19	137	0	64	4	16	6	58	0	6	
25	489	0	0	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	
26	492	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	493	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
28	496	28	216	545	33	28	9	104	435	11	382	6	255	64	357	77	5	
29	536	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	539	0	6	8	3	0	0	3	1	0	0	2	5	0	1	0	1	
31	543	0	10	3	1	0	0	1	0	0	31	5	2	1	0	4	0	
32	546	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	

tax_count_oral

Figura 21. Tabla de conteos de OTUs.