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

Caracterización del microbioma oral usando tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos, 2024

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista

AUTOR

Laly Abigail ROJAS RODRÍGUEZ

ASESOR

Dra. Tania Valentina ROSALES CIFUENTES

Lima, Perú

2025



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

Rojas L. Caracterización del microbioma oral usando tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos, 2024 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2025.

METADATOS COMPLEMENTARIOS

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Laly Abigail Rojas Rodríguez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71469569
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0009-4844-5547
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Tania Valentina Rosales Cifuentes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	04072471
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2164-6110
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	Elba Martínez Cadillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08621492
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Tania Valentina Rosales Cifuentes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	04072471

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	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Institución Educativa N° 3036 José Andrés Rázuri País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Martín de Porres Calle: Av. 12 de octubre 955 Latitud: -12.036739 Longitud: -77.090474 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	2023 - 2025
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 América
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA PROFESIONAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN PRESENCIAL N.º 009

Los Docentes que suscriben, reunidos el 10 de septiembre de 2025 en la ciudad de Lima, siendo las 13:00 horas, por encargo de la Señora Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista de la Bachiller:

LALY ABIGAIL ROJAS RODRÍGUEZ

CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis **«CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA ORAL USANDO TECNOLOGÍA DE OXFORD NANOPORE EN NIÑOS PERUANOS, 2024»** y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demostró un grado de aprovechamiento:

SUBRESALIENTE
(escala)

Siendo calificada con un promedio de: DIECINUEVE (en letras) 19 (en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los diez días del mes de septiembre del año dos mil veinticinco.

PRESIDENTE DEL JURADO

Dr. Donald Ramos Perfecto

MIEMBRO SECRETARIO

Blga. Elba Martínez Cadillo

MIEMBRO VOCAL (ASESOR)

Dra. Tania Valentina Rosales Cifuentes

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

Anexo 1
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Tania Valentina Rosales Cifuentes, en mi condición de asesora acreditada con el Dictamen de la EPO N°0017 de la tesis, cuyo título es:

"CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA ORAL USANDO TECNOLOGÍA DE OXFORD NANOPORE EN NIÑOS PERUANOS, 2024" presentado por la bachiller Laly Abigail Rojas Rodríguez **para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista.**

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 7% 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 **Título Profesional de Cirujana Dentista.**

Lima, 17 de setiembre de 2025

Firma de la Asesora: 

Nombres y Apellidos de la asesora: Tania Valentina Rosales Cifuentes

DNI: 04072471

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A mi mamita Rafaela y a mi tío Licarión,

quienes fueron mis pilares en la educación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por escuchar mis oraciones en momentos de fragilidad.

A mis padres Víctor y María, por ser mi soporte en este largo camino, por su infinita paciencia y por estar en los momentos más duros, pero también felices de mi vida.

A mi tío Julián, por ser parte de mi formación académica a lo largo de mi vida y por su preocupación en el avance de la tesis.

A mi asesora, la Dra. Tania Rosales, por permitirme ser parte de la investigación financiada mediante el grupo Biotecnología Estomatológica.

Al Dr. Donald Ramos y a la Biolg. Elba Martínez por sus recomendaciones y su paciencia al orientarme en el proceso de revisión de la tesis.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la caracterización de comensales orales del microbioma oral, usando Tecnología Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries. **Metodología:** Se recolectó muestras de saliva no estimulada de 30 niños y se les realizó un examen oral para tener un diagnóstico previo de caries dental y para cuantificar las piezas dentales con presencia de caries. En laboratorio, se realizó la extracción del ADN para después preparar la librería y poder secuenciar genéticamente haciendo uso de un secuenciador minION. Se realizó un análisis descriptivo para lograr detallar la abundancia relativa según *phylum*, género y especie. **Resultados:** Se generó resultados automáticamente a través del programa del flujo de trabajo wf-16s nextflow v1.2.0. Entre los más relevantes, en el grupo de niños con caries se encontró *phylum Firmicutes* (35%) y *Proteobacterias* (1.04%), géneros *Streptococcus* (31.66%) y *Veillonella* (1.20%); y especies *Streptococcus salivarius* (16.33%) y *Streptococcus parasanguinis* (3.54%); a diferencia del grupo de niños sin caries donde se encontró *phylum Firmicutes* (29.90%) y *Proteobacterias* (2.54%), géneros *Streptococcus* (27.33%) y *Veillonella* (0.31%); y especies *Streptococcus salivarius* (12.15%) y *Streptococcus parasanguinis* (2.25%). **Conclusiones:** La abundancia y diversidad del microbioma bucal pudo ser identificada encontrando una diferencia significativa comparando ambos grupos de muestras de saliva de niños con caries y aquellos sin caries.

Palabras claves: microbioma, tecnología, caries, saliva, ADN

ABSTRACT

Objective: Determine the caracterización of oral commensals of the oral microbiome, using Oxford Nanopore Technology in Peruvian children with and without dental caries. **Methodology:** Non.stimulated saliva samples were collected from 30 children, also an oral examination was performed to have a prior diagnosis of dental caries and to quantify the teeth with the presence of caries. In the laboratoy, DNA extraction was carried out to prepare the library later and allow it to be genetically sequenced using a minION sequencer. A descriptive análisis was conducted to detail the relative abundance according to *phylum*, genus ans species. **Results:** Results were generated automatically through the wf-16s next Flow v1.2.0 workflow program. Among the most relevant findings, in the group of children with dental caries, the phyla *Firmicutes* (35%) and *Proteobacterias* (1.04%) were found, as well as the genera *Streptococcus* (31.66%) and *Veillonella* (1.20%); and the species *Streptococcus salivarius* (16.33%) and *Streptococcus parasanguinis* (3.54%). In contrast, in the group of children without dental caries, the phyla *Firmicutes* (29.90%) and *Proteobacterias* (2.54%) were found, as well as the genera *Streptococcus* (27.33%) and *Veillonella* (0.31%); and the species *Streptococcus salivarius* (12.15%) and *Streptococcus parasanguinis* (2.25%). **Conclusions:** The abundance and diversity of the oral microbiome could be identified a significant difference comparing both groups of saliva samples from children with dental caries and those without dental caries.

Key words: mycobiome, technology, dental caries, saliva, DNA

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 11
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 12
a) Área Problema 12
b) Delimitación 14
c) Formulación del problema 15
d) Objetivos 15
i. Objetivo General 15
ii. Objetivos Específicos 16
e) Justificación 16
i. Justificación social 16
ii. Justificación práctica 17
iii. Justificación teórica 17
iv. Justificación metodológica 17
f) Limitaciones 17
III. MARCO TEÓRICO 18
3.1. Antecedentes 18
3.2. Bases teóricas 21
3.2.1.Microbioma Oral 21
3.2.1.1. Nichos Ecológicos de la Cavidad Oral 21
3.2.1.2. Distribución del Microbioma Oral 22
3.2.2.Técnicas de Estudio del Microbioma Oral 25
3.2.2.1. Técnica Basada en Cultivo 25
3.2.2.2. Técnica Basada en Hibridación ADN – ADN 25
3.2.2.3. Técnica Basada en PCR 26
3.2.2.4. Técnica Basada en la Secuenciación del ADN 26
3.2.3.Tecnología Oxford Nanopore – MinION 27
3.3. Definición de términos 29
3.4. Hipótesis 31
3.4.1.Hipótesis general 31
3.4.2.Hipótesis especificas 31
3.5. Operacionalización de variable 32
IV. METODOLOGÍA 36
4.1. Tipo de investigación 36
4.2. Población y muestra 36
4.2.1.Población 36

4.2.2.Muestra 36
4.2.2.1. Criterios de inclusión 36
4.2.2.2. Criterios de exclusión 37
4.3. Procedimientos y Técnicas 37
4.3.1.Procedimientos antes de la recolección de muestras biológicas 37
4.3.2.Recolección de muestras biológicas 37
4.3.3.Procedimientos en el laboratorio 38
4.3.3.1. Extracción del ADN 38
4.3.3.2. Preparación de la librería 39
4.3.3.3. Secuenciación genómica 40
4.4. Procesamiento de datos 41
4.5. Análisis de resultado 41
V. RESULTADOS 42
5.1. Presencia de caries y conteo de piezas dentales con caries 42
5.2. Registro y codificación de las muestras 43
5.3. Composición taxonómica del microbioma salival 46
VI. DISCUSIÓN 90
VII. CONCLUSIONES 92
VIII. RECOMENDACIONES 93
IX. BIBLIOGRAFÍA 94
X. ANEXOS 99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Phylum* y géneros más frecuentes 22

Tabla 2. Especies más frecuentes 24

Tabla 3. Presencia de caries y cantidad de piezas dentales con caries 42

Tabla 4. Codificación de las 30 muestras 44

Tabla 5. Abundancia relativa a nivel *phylum* en el total de las muestras de saliva 46

Tabla 6. Abundancia Relativa a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con presencia de caries 47

Tabla 7. Abundancia Relativa a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños sin presencia de caries 48

Tabla 8. Diferencias a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con caries y sin caries 49

Tabla 9. Abundancia relativa a nivel género en el total de las muestras de saliva 51

Tabla 10. Abundancia relativa a nivel género en muestras de saliva de niños con presencia de caries 54

Tabla 11. Abundancia relativa a nivel género en muestras de saliva de niños sin presencia de caries 57

Tabla 12. Diferencias a nivel género en muestras de saliva de niños con caries y sin caries 60

Tabla 13. Abundancia relativa a nivel especie en el total de las muestras de saliva 63

Tabla 14. Abundancia relativa a nivel especie en muestras de saliva de niños con presencia de caries 68

Tabla 15. Abundancia relativa a nivel especie en muestras de saliva de niños sin presencia de caries 76

Tabla 16. Diferencias a nivel especie en muestras de saliva de niños con caries y sin caries 83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diferencias a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con caries y sin caries 49

Gráfico 2. Diferencias a nivel género en muestras de saliva de niños con caries y sin caries 62

Gráfico 3. Diferencias a nivel especie en muestras de saliva de niños con caries y sin caries 89

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia 99
Anexo 2. Carta de presentación 100
Anexo 3. Consentimiento informado de los padres / tutores 101
Anexo 4. Asentimiento informado de los alumnos menores de edad 103
Anexo 5. Ficha de recolección de datos 104
Anexo 6. Historia clínica odontológica / odontograma 104
Anexo 7. Constancia de aprobación de Comité de Ética 105
Anexo 8. Formato del servicio prestado de la Facultad de Ciencias Biológicas 106
Anexo 9. Reporte de secuenciación wf-16s mediante diagrama de barras de la abundancia según *phylum* 107
Anexo 10. Reporte de secuenciación wf-16s mediante diagrama de barras de la abundancia según género 108
Anexo 11. Reporte de secuenciación wf-16s mediante diagrama de barras de la abundancia según especie 109
Anexo 12. Evidencias fotográficas: Recolección de muestras 110
Anexo 13. Evidencias fotográficas: Extracción del ADN 112
Anexo 14. Evidencias fotográficas: Preparación de la librería 113
Anexo 15. Evidencias fotográficas: Secuenciamiento 114
Anexo 16. Evidencias fotográficas: Procesamiento de datos 115

I. INTRODUCCIÓN

El microbioma oral ha causado un revuelo en lo que respecta detección y clasificación de microorganismos bacterianos, y cómo esto puede estar envuelto en enfermedades no solo bucales, sino también enfermedades provenientes de otras partes del cuerpo[1]. Por ende, con la evaluación de secuencias de ADN se ha logrado comprender qué función puede cumplir las bacterias en sus ecosistemas primarios[2]. Con todo ello, poder intervenir de forma correcta será más factible ya que se tendrá la información clínica y genómica.

Debido al Proyecto Microbioma Humano, se ha logrado entender mejor ciertas enfermedades producidas por bacterias que cambian sus comunidades por algunos factores[3], por ejemplo, se puede modificar por cambios en hábitos alimenticios[4]. La forma clásica de aislar bacterias es mediante el cultivo; sin embargo, la mayoría de microorganismos existentes no son cultivables, es por ellos que con el pasar del tiempo, la metagenómica está posibilitando conocer sobre ellos a través de la secuenciación genética; en este caso, la Tecnología de Oxford Nanopore que trae consigo el minION[5].

El minION es un instrumento novedoso que tiene como ventajas la portabilidad y el corto tiempo para reconocer una especie, gracias a la preparación de librerías de ADN[6]. Se puede innovar las capacidades de investigadores pertenecientes al sector salud para que secuencien en tiempos de aparición de enfermedades[7].

Debido a esto, tener la posibilidad de utilizar nuevas tecnologías ha sido un factor importante para la realización de esta investigación en una población de niños peruanos, que no se ha realizado con anterioridad; lo cual destaca la importancia de encontrar una gran cantidad y diversidad de especies, cuantificarlas y relacionarlas a la presencia de caries.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

a) Área Problema

El concepto de microbioma oral fue propuesto por primera vez por Joshua Lederberg, quien acuñó el término “microbioma” para referirse a la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que literalmente comparten nuestro espacio corporal[8].

El microbioma oral se define como el genoma colectivo de microorganismos en la cavidad oral. Es la segunda comunidad microbiana más grande en humanos, después del intestino[9]. El hecho de que el microbioma se encuentre en un huésped que se relacione con un ecosistema, inevitablemente hace que sea un genoma que interactúe constantemente con el medio ambiente, por lo que un cambio en la composición o función del entorno, disbiosis, afecta de forma directa al microbioma, que puede provocar cambios en la respuesta inmunitaria y producir enfermedades[10].

Los métodos independientes del cultivo han progresado para nuestro conocimiento de la diversidad microbiana en la cavidad oral. Los enfoques sustentados en secuencias para analizar la composición microbiana abarcan enfoques de biomarcadores que se centran en un solo gen microbiano ubicuo específico del reino o en una región que presenta hipervariabilidad de secuencia[1].

Existen estudios anteriores en las que han explorado el microbioma oral de niños y adultos tales como Crielaard et al., (2011) quien evaluó la composición microbiana salival mediante pirosecuenciación con código de barras de las regiones hipervariables V5-V6 del ARNr 16 S y el uso de micromatrices filogenéticas[11]. Así también, Takeshita (2016) el cual utilizó la secuenciación de alto rendimiento de la nueva generación del gen rRNA para determinar la composición del microbioma salival de una población japonesa[12].

La obtención de genomas completos y precisos es importante para el estudio de cualquier organismo. Antes, la obtención de genomas completos de bacterias abarcando los del microbioma humano, precisaba con frecuencia el aislamiento del organismo como también métodos de secuenciación manual de bajo rendimiento para resolver regiones repetidas. Los avances en las tecnologías de secuenciación de lectura larga, incluido Oxford Nanopore, permitieron lograr genomas bacterianos completos y cerrados a partir de muestras metagenómicas[13].

MinION (Oxford Nanopore) es una de las tecnologías más actuales para secuenciar ADN y proteínas específicas por electricidad. Mide el cambio en la corriente resultante de las cadenas de ADN que se relaciona con un nanoporo de proteína cargada[5]. La velocidad en la que, cada hebra de ADN se mueve a través del nanoporo está controlada por una enzima de procesamiento unida al ADN en el orificio del poro. Se pueden leer hasta 512 moléculas de ADN simultáneamente usando amplificadores que se dirigen de forma independiente a cada nanoporo[14].

Así también, MinION tiene otros beneficios, como la preparación sencilla de muestras, la portabilidad, la rapidez de respuesta y la maniobrabilidad. El protocolo de preparación rápida de bibliotecas de MinION se lanzó en mayo 2016, que permite la preparación de bibliotecas en 10 minutos desde el ADN hasta la identificación bacteriana. Este protocolo solo lee la hebra plantilla de ADN de doble hebra (secuenciación 1D) y, en un principio, se consideró de calidad relativamente baja. Por el contrario, el protocolo de preparación de la biblioteca original produjo datos de ambas cadenas (secuenciación 2D), pero requirió 90 minutos para la preparación de la biblioteca[15].

La cavidad oral representa un 25% del microbioma humano, debido a su complejidad filogenética es necesario el uso de la tecnología Ómica, que ha demostrado resultados efectivos en el campo de la biotecnología, la tecnología de secuenciación de última

generación Oxford Nanopore utiliza un gen de referencia, y realiza técnicas de secuenciación masiva permitiendo realizar un análisis detallado a gran escala de la microbiota oral y salival con un nivel de detalle de la taxonomía y función de los microorganismos a partir del ADN permitiendo la investigación simultánea de la actividad patógena, la inmunidad del huésped y la dieta. Se hace necesario caracterizar el microbioma oral completo con secuenciación de genomas, usando tecnología Oxford Nanopore en niños peruanos, lo que permitirá conocer las comunidades bacterianas completas y sus interacciones entre ellas para entender la actividad bacteriana en condiciones de salud y enfermedad y posibles nuevos diagnósticos, tratamientos y estrategias de prevención de salud oral[16].

b) Delimitación

Según la OMS, la caries dental es la enfermedad infecciosa más frecuente a nivel mundial, que afecta entre el 60% y 90% de la población escolar[17]. El Ministerio de Salud (Minsa) informó que hay una prevalencia de caries del 85.6% en escolares de 3 a 15 años, lo que quiere decir que 9 de cada 10 alumnos tienen esta enfermedad[18].

Entre el 2010 y 2022, por medio de la revisión de la literatura, se obtuvo que la prevalencia de caries dental en niños menores de 12 años se hallaba entre el 90% y 94.3%[19]. Según el Repositorio Único Nacional de Información en Salud (REUNIS) se encuentran los siguientes datos sobre morbilidad por categoría según caries dental en niños entre 6 a 11 años, en el año 2024: en el mes de setiembre fue de 7731, en el mes de octubre fue de 5975 y en el mes de noviembre fue de 1364[20].

La composición del microbioma oral es relativamente estable a lo largo de la vida, sin embargo, es posible observar cambios en el microbioma oral a lo largo de diferentes etapas en un individuo o entre individuos. La variabilidad que presenta el microbioma

oral humano, está reportada actualmente en *la Expanded Human Oral Microbioma Database* que incluye 775 especies microbianas[21].

En nuestro país se han realizado pocos estudios para determinar el microbioma oral y para caracterizar el microbioma oral, además de haber usado métodos convencionales. Tenemos a Chavez (2023) quien evaluó el microbioma oral de pacientes hospitalizados mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias[22].

Debido a ello, es necesario investigar en nuestra población, haciendo uso de una nueva técnica como lo es la Tecnología de Oxford Nanopore, en la que se partirá de la toma de muestra salival, extracción de ADN y una secuenciación genómica. Esto es importante en un niño, ya que la colonización y maduración del microbioma en etapas tempranas genera variabilidad y, altera la función patogénica y protectora al mismo tiempo, por lo tanto, el cuidado oral y su prevención es de suma importancia[23].

c) Formulación del problema

¿Cuál es la caracterización del microbioma oral usando Tecnología de Oxford Nanopore en 30 niños peruanos de 8 a 10 años?

d) Objetivos

i. Objetivo General

Determinar la caracterización de comensales orales del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.

ii. Objetivos Específicos

- Determinar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a los *phylum* del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.
- Determinar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a los géneros del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.
- Determinar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a las especies del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.
- Comparar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a los *phylum,* géneros y especies del microbioma oral obtenidos por Tecnología de Oxford Nanopore, de niños peruanos con caries y sin caries.

e) Justificación

i. Justificación social

El aporte social lo sustentamos en que la caries dental es una enfermedad altamente prevalente en nuestro país, según REUNIS la prevalencia de caries dental en niños menores de 12 años se halla entre el 90% y 94.3%, aún no se han caracterizado las diversas variaciones del microbioma oral a nivel de regiones[19], nuestro estudio permitirá conocer las comunidades bacterianas completas en el ecosistema primario y para entender la actividad bacteriana en condiciones de salud y enfermedad, con esta data se podrán implementar protocolos de atención con nuevas estrategias de prevención de salud oral en niños menores de 12 años.

ii. Justificación práctica

El aporte práctico se realizará al determinar con precisión el estudio de las comunidades bacterianas completas usando pequeñas muestras microbianas mediante el análisis total de ADN con el apoyo de las tecnologías genómicas, metagenómica y secuenciación de última generación (NGS) la cual nos abre un camino prometedor.

iii. Justificación teórica

El aporte teórico se dará al contribuir con el conocimiento de la diversidad microbiana de la cavidad oral, que según antecedentes son alrededor de 700 especies conocidas que aún no se han caracterizado.

iv. Justificación metodológica

El presente trabajo se justifica a nivel metodológico porque aporta un nuevo instrumento como la ficha microbiológica para la caracterización del microbioma oral según *phylum*, género y especie.

f) Limitaciones

Las limitaciones del proyecto fue la de no contar con equipamiento de un laboratorio de investigación en el área de Biología Molecular de la Facultad de Odontología y de personal capacitado. Para la ejecución del proyecto se contó con el apoyo del departamento de Genética y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes

Crielaard et al., (2011) realizaron un estudio en 74 niños agrupados en niños con caries, niños tratados por caries y niños sin caries de los cuales recolectaron muestras de saliva con el objetivo de evaluar el microbioma oral por medio de una pirosecuenciación paralela del gen16s rRNA; de lo que se obtuvo como resultado 8 filos y 113 taxones superior y de estos 4 filos fueron predominantes *Firmicutes, Bacteriodetes, Proteobacteria y Actinobacteria*[11].

Lif et al., (2015) realizaron un estudio longitudinal con el objetivo de analizar el microbioma oral de muestras de biopelículas orales y saliva en niños de 3 meses a 3 años y establecer la aparición de caries a los 3 años. Se examinó por cultivo, detección por PCR, pirosecuenciación e identificación por microarrays HOMIM (*Human Oral Microbe Identification Microarray*). Se identificaron en niños de 3 años especies como *Actinobaculum*, *Streptococcus*, *Aggregatibacter* y *Actinomyces*. En niños de 3 meses, el microbioma no se asoció al avance de caries, salvo los *Lactobacillus*[24].

Ma et al., (2015) compararon los perfiles microbianos orales entre niños con caries de la primera infancia y niños sin caries. Utilizaron el TIANamp Bacteria DNA Kit para extraer el ADN bacteriano de la saliva y placa supragingival. Hallaron 379 especies bacterianos, de los cuales se encontró que *Granulicatella adiacens, Campylobacter concisus, Streptococcus australis, Streptococcus mitis y Veillonella* dispar se encuentran entre las especies más frecuentes en el grupo de caries de la primera infancia[25].

Takeshita et al., (2016) evaluaron la composición del microbioma salival de una población adulta en Japón. Analizaron el amplicón del gen 16sS rRNA y se obtuvo que 72 unidades taxonómicas operativas (OTU) estaban presentes en más del 75% en la

saliva y pertenecían a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Granulicatella adiacens*, *Porphyromonas gingivalis* y otras[12].

Eriksson et al., (2017) evaluaron la saliva y *biofilm* dental de jóvenes de 17 años con el fin de caracterizar el microbioma, por medio de la extracción de ADN y secuenciación del amplicón 16S rDNA mediante el uso de las plataformas Ilumina MiSeq y PacBio RS IISMRT. Se obtuvo como resultado *Scardovia wiggsiae*, *S. mutans* y *Bifidobacterium longum* relacionados al predominio de caries[26].

Cedeño et al., (2020) realizaron un estudio descriptivo, inductivo-deductivo, transversal, no experimental para determinar las características del microbioma oral en adolescentes de 15 años. Realizaron toma de muestra de placa bacteriana para luego realizar el estudio microbiológico mediante la técnica de Conteo Bacteriológico, concluyendo que en las piezas cariadas predominaron *S. mutans*, *Staphylococcus salivarius* y *Streptococcus oralis*; y en piezas sin caries predominaron *Staphylococcus Sp.* y *Staphylococcus albus*[27].

García et al., (2021) realizaron un estudio recolectando muestras de saliva y placa en 143 niños. Al investigar el microbioma mediante la tecnología Nanopore MinION, encontraron que los *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius* fueron los más abundantes, caso contrario con el *S. mutans* el cual abarcó menos del 5% del microbioma total; además, obtuvieron que el *Streptococcus parasanguinis* era predominante en niños con caries recurrente activa[28].

Chilon et al., (2022) realizaron un estudio descriptivo, retrospectivo, transversal y cuantitativo para detallar el perfil microbiológico de los microorganismos aislados de pacientes de un hospital de Lambayeque según las muestras de cultivo de secreción bronquial, procesadas en el sistema VITEK y registradas en los archivos del laboratorio. Como resultado se obtuvieron a los microorganismos más frecuentes

como *Acinetobacter baumannii complex*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*[29].

Jitvaropas et al., (2022) realizaron una investigación transversal que consistió en comparar el microbioma salival y los patógenos bacterianos en un grupo positivo asintomático de COVID-19 con un grupo negativo. Se recolectó muestras de saliva de 82 personas para luego realizar secuenciación larga del ADNr 16S bacteriano. En ambos grupos, se encontró principalmente *Veillonella parvula, Streptococcus mitis y Prevotella melaninogenica*[30]*.*

Raksakmanut (2022) realizó un estudio de casos y controles dentro de un estudio de cohorte prospectivo para predecir el riesgo de caries luego de 1 año de seguimiento. Las muestras fueron la saliva de niños de 2 años. Se usó la tecnología Illumina MiSeq. Luego del seguimiento, se obtuvo que las especies que prevalecían fueron *Streptococcus spp., Alloprevotella sp HMT 473, Veillonella sp. HMT 780, Neisseria spp. Porphyromonas pasteri* y *Granulicatella elegans* ; además, se observó que hubo especies no clasificables[31].

Chavez (2023) realizó una investigación observacional, prospectivo, transversal y descriptivo en la cual evaluó 43 pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del hospital de Huánuco. Las muestras fueron obtenidas mediante frotis del dorso de la lengua, superficie de los dientes y mucosa yugal para luego realizar un conteo de las Unidades Formadoras de Colonias. Como resultado identificó una mayor frecuencia de Cocos Gram (+) en la zona de la lengua y mucosa yugal, y Fungi (*Candida* y otros) en la zona de la mucosa yugal[22].

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Microbioma Oral

El microbioma humano está definido como un ecosistema interno que está formado por el ser humano y los microorganismos que cohabitan en él. Por otro lado, la microbiota es la diversidad de microorganismos que se encuentran en conexión con el huésped[10].

Cada persona tiene su propio microbioma único ya que el microbioma se establece a partir de la genética, edad, dieta e interacciones con el medio ambiente[5].

La microbiota oral se puede definir como un diverso grupo de biopelículas microbianas. Luego del intestino, la cavidad oral engloba el segundo microbioma más complejo del cuerpo humano. A su vez, la microbiota oral es más constante a lo largo del tiempo, esto implica que después de factores estresantes externos como el uso de antibióticos, experimenta alteraciones a corto plazo[32].

3.2.1.1. Nichos Ecológicos de la Cavidad Oral

En la boca se encuentra diversos nichos ecológicos como los dientes, lengua, surco gingival, mejillas, paladar duro, paladar blando y otros[10]. Existen diferentes hábitats en diversos lugares anatómicos a pesar de estar vinculados por la saliva. Hay diferencias considerables entre las superficies orales, como, por ejemplo: las superficies dentales duras[32], la mucosa y su diversidad[33], además está el epitelio crevicular, y se suma la prótesis y ortodoncia[32].

Desde el nacimiento hasta la sexta semana, se produce una reestructuración de la microbiota debido a factores como el pH, oxígeno, ligandos de las adhesinas bacterianas y nutrientes. Debido a esto se disponen nichos diversos

conformados por un conjunto de organismos que poseen distintas propiedades funcionales. Posteriormente, se ve afectado el equilibrio relativo de los integrantes del microbioma oral producto de la erupción de dientes, pubertad y embarazo, pero no más que su existencia[34].

Toda superficie oral posee de una microbiota en específico, estructurado como un biofilm. Además, en ese mismo hábitat de la superficie dental, cambia la disposición de la comunidad bacteriana debido a la posición dental. Por ende, cada microhábitat conserva un ecosistema propio con pH, presión parcial de oxígeno, salinidad, temperatura, etc., que repercute en la formación de microorganismos y establece un microbioma variado[32].

El microbioma de la cavidad bucal es muy estudiado hasta el momento. Presenta 392 taxones que poseen por lo menos un genoma de referencia, además la cantidad total de genomas que se encuentra en la cavidad oral es próxima a 1500[9].

3.2.1.2. Distribución del Microbioma Oral

En la cavidad oral se han establecido alrededor de 700 especies de procariotas, los cuales corresponden a 185 géneros y 12 *phylum*. De estos, casi el 54% han adquirido un nombre oficial, el 14% se cultiva, pero no tienen un nombre oficial, y el 32% solamente son identificados como filotipos no cultivados[9].

Entre los *phylum* y los géneros más frecuentes en la cavidad oral se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1. *Phylum* y géneros más frecuentes

Phylum	✓ *Actinobacteria*	✓ *Gracilibacteria*
	✓ *Bacteriodetes*	✓ *Proteobacteria*

	✓ *Chlamydiae*		✓ *Saccharibacteria*
	✓ *Chloroflexy*		✓ *Spirochaetes*
	✓ *Firmicutes*		✓ *SR1*
	✓ *Fusobacteria*		✓ *Synergistetes*
Género	Gram (+)	Cocos	✓ *Abiotrophia*
			✓ *Peptostreptococcus*
			✓ *Streptococcus*
			✓ *Stomatococcus*
		Bastones	✓ *Actinomyces*
			✓ *Bifidobacterium*
			✓ *Corynebacterium*
			✓ *Eubacterium*
			✓ *Lactobacilus*
			✓ *Propionilbacterium*
			✓ *Pseudoramibacter*
			✓ *Rothia*
	Gram (-)	Cocos	✓ *Moraxella*
			✓ *Neisseria*
			✓ *Veilonella*
		Bastones	✓ *Campylobacter*
			✓ *Capnocytophaga*
			✓ *Desulfobacter*
			✓ *Desulfovibrio*
			✓ *Eikenella*
			✓ *Fusobacterium*
			✓ *Haemophilus*
			✓ *Leptotrichia*

✓ *Prevotella*
✓ *Selemonas*
✓ *Simonsiella*
✓ *Treponema*
✓ *Wolinella*

Fuente: Deo P, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J Oral MaxillofacPathol[9]

Gran parte de los estudios se asemejan en el predominio del *phylum Firmicutes* y del género *Streptococcus*; así como la manifestación de periodontopatógenos, como lo son las *Porphyromonas* o *Treponema*, en personas sanas[32].

Entre las especies que se encuentran en la cavidad oral, las más frecuentes según número de genomas, se encuentran detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies más frecuentes

Especies		
✓ *Streptococcus mutans*	✓ *Agregatibacter actinomycetemcomitans*	✓ *Staphylococcus aureus*
✓ *Streptococcus mitis*	✓ *Streptococcus parasanguinis*	✓ *Porphyromonas gingivalis*
✓ *Streptococcus salivarius*	✓ *Escherichia coli*	✓ *Haemophilus influenzae*
✓ *Streptococcus oralis*	✓ *Streptococcus sanguinis*	✓ *Streptococcus pyogenes*

Fuente: Expanden Human Oral Microbiome Database V3.1[35]

Protozoos, hongos y virus se encuentran en la cavidad oral. Entre los protozoos más frecuentes está la *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax*. El hongo más

predominante es la especie *Candida*[9]. Los virus contribuyen en el ecosistema bucal debido a que son estables y específicos para cada persona; a pesar de ello, son escasos los estudios referidos a ellos[10].

3.2.2. Técnicas de Estudio del Microbioma Oral

Constantemente se ha buscado reconocer bacterias que pueden ser cultivadas; sin embargo, se cree que la gran mayoría de las bacterias del planeta no han sido cultivadas ya que continúa siendo un reto. A pesar de todo, investigadores han caracterizado y clasificado casi el 50% de las 700 especies que regularmente se encuentran colonizando la boca; pero las demás especies aún son renuentes al cultivo[2].

3.2.2.1. Técnica Basada en Cultivo

De manera tradicional, para realizar el cultivo de bacterias se necesita tomar una muestra, transportarlo y reservarlo en un medio adecuado. Luego, el uso de distintos medios de cultivo para la dispersión y cultivo de bacterias en placas. Después que las bacterias son aisladas, estas son caracterizadas por su apariencia y pruebas bioquímicas[2].

3.2.2.2. Técnica Basada en Hibridación ADN – ADN

La hibridación consiste en la asociación involuntaria de dos cadenas coincidentes de una doble hélice de ácido nucleico. Esta técnica emplea sondas de ADN de una cadena delimitado con un isótopo radioactivo, etiqueta fluorescente o quimioluminiscente que se van a unir a las bases complementarias de una cadena de ADN objetivo y así establecer un dúplex para que posteriormente pueda ser percibido haciendo uso de un instrumento que sea adecuado o por reactivos químicos. Entre estas técnicas se encuentran[2]:

- Hibridación de ADN – ADN de tablero de ajedrez genómico completo
- Hibridación de oligonucleótidos de captura inversa
- Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)
- Tecnología de micromatrices de ADN

3.2.2.3. Técnica Basada en PCR

Esta técnica se apoya en dos cebadores de oligonucleótidos específicos que sitúa la secuencia de ADN objetivo, para luego amplificarse a través de una enzima ADN polimerasa termoestable. Entre estas técnicas se encuentran[2]:

- PCR convencional (PCR)
- PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR, qRT-PCR)
- PCR – electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (PCR – DGGE)
- ADN polimórfico amplificado aleatoriamente / PCR cebado arbitrariamente (RAPD / PCR)
- PCR basada en elementos repetitivos (Rep – PCR)
- Tripificación de secuencias multilocus (MLST)
- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T – RFLP)

3.2.2.4. Técnica Basada en la Secuenciación del ADN

Actualmente, el desarrollo en tecnología para la detección molecular ha dado lugar a las técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS). Aún se fundamenta en el Principio de Sanger; sin embargo, se añade PCR en la identificación de variaciones en las características del ADN a lo largo de la

secuenciación. Debido a su carácter independiente posibilitan investigaciones establecidas en conjeturas sobre microorganismos que no se conocen y no han sido clasificados. Esta técnica tiene como ventajas como que brinda costos no elevados y proporciona la oportunidad de ejecutar el análisis de genomas bacterianos en horas o días[2]. Además, esta técnica tiene mucha productividad y no necesita clonamiento[36]. Entre estas técnicas se encuentran[2]:

- Secuenciación de primera generación: secuenciación de Sanger (dideoxy)
- Secuenciación de próxima generación (NGS)
- Plataformas NGS iniciadoras:
    - Roche / 454 GS
    - Life Technologies SOLiD
- Plataformas NGS actuales:
    - Illumina MiSeq / HiSeq
    - Life Technologies PGM (Ion Torrent)
    - Secuenciación en tiempo real de una sola molécula (SMRT)
    - MinION (secuenciación de nanoporos)

3.2.3. Tecnología Oxford Nanopore – MinION

MinION es un secuenciador portátil que calcula la variación en la corriente resultante de las cadenas de ADN que interaccionan con un nanoporo de proteína cargada[5].

Descifra la secuencia de nucleótidos de hebras de ADN individuales en tanto que son trasladadas por medio de nanoporos biológicos por un campo eléctrico aplicado. La velocidad está regulada por una enzima que se encuentra pegada al ADN en el agujero del poro. Puede interpretar hasta 512 moléculas de ADN a la vez, empleando amplificadores que van por cuenta propia a cada nanoporo[14].

Los dispositivos de secuenciación Oxford Nanopore se apoyan en las celdas de flujo, lugar donde se encuentran los nanoporos. MinION *Flow Cell* puede producir hasta 50 Gb de datos para secuenciar ADN, ADNc o ARN nativo en tiempo real[37].

Este dispositivo portátil MinION es vinculado a una computadora y/o laptop a través de un USB con el fin de observar los datos de rendimiento en tiempo real. El proceso se basa en que una corriente eléctrica debe de atravesar membranas que son renuentes a la electricidad, los cuales se encuentran ancladas a una serie de nanoporos proteicos. Se van a originar cambios en la corriente eléctrica mientras que el ADN atraviesa los nanoporos y se van a producir señales que serán evaluadas y así precisar la secuencia de bases[38].

Mientras la hebra de ADN o ARN atraviesa el poro, se produce los cambios en la corriente que está siendo reconociendo por un software. Al continuo cambio de corriente, se le llama *Squiggle* (garabato). Este garabato es procesado por el software en lecturas en tiempo real y cada lectura que se escribe en archivos FAST5, pertenece a una sola hebra de ADN o ARN. La señal sin tratar y la información que se encuentra en el garabato es determinada por la configuración del nanoporo. Distintos nanoporos poseen diversos *readers* (lectores), los cuales colaboran al bloqueo de la corriente[39].

La señal que se encuentra guardada en los archivos FAST5 es procesado por algoritmos *basecalling* para descifrar la secuencia de bases en archivos FASTQ. Antes que la hebra de ADN / ARN haya atravesado en su totalidad el nanoporo,

basecalling ya pudo haber empezado. *Basecalling* son llevados a cabo en el CPU, pero se impulsa implementándolo para emplear unidades de procesamiento gráfico que son idóneos para computar bastante valores al mismo tiempo[39].

3.3. Definición de términos

Amplicón

Es el grupo de moléculas de ADN iguales, amplificado de la reacción en cadena de la polimerasa[40].

Biopelícula

Es el conjunto de microorganismos, conformada por células que se encuentran adheridas a un sustrato, formando una comunidad microbiana organizada[41].

Ecosistema

Es un grupo complejo reemplazados por seres vivos y medio ambiente, los cuales se relacionan en distinto espacio y tiempo[42]. La cavidad oral hospeda un ecosistema muy elaborado que incluyen microambientes distintos y existen diversos microorganismos que lo conforman[43].

Filo

Es la clasificación taxonómica, existen grupos que se encuentran en cada Reino. Estos grupos son llamados División, cuando se refiere a plantas y hongos; y Filo o *phylum*, cuando se refiere a animales u otros seres[44]. Engloba formas de vida en un mismo grupo[45].

Filotipo

Es una asociación taxonómica que están determinado por la semejanza entre secuencias de ADN del gen 16S[46].

Nanoporo

Es un orificio diminuto que mide 1mm de diámetro, medido internamente[47]. Es muy pequeño que se encuentra introducido en una membrana[48].

Nicho Ecológico

El término nicho ecológico se refiere a la relación de una especie o población mediante su conducta y respuesta con los factores como temperatura, nutrientes, etc[49].

Nucleótido

Es la estructura elemental del ADN y ARN; está conformado por una molécula de azúcar, la desoxirribosa y ribosa respectivamente, que se encuentra junto a un grupo fosfato y una base nitrogenada que son adenina, citosina, guanina y timina para el ADN al igual que para el ARN; la diferencia para este último es que tiene como base al uracilo en vez de timina[50].

Perfil Microbiológico

Es el registro donde se encuentran los datos de frecuencia y resistencia que pertenece a los microorganismos tomados de una muestra de pacientes[29].

Pirosecuenciación

Es una técnica usada para la secuenciación por síntesis de ácidos nucleicos; esto es, utiliza una hebra molde de ADN para, al mismo tiempo, sintetizar la cadena complementaria de una base[51].

Secuenciación

Es una técnica usada para reconocer rápidamente a genes[52]. Consiste en establecer la secuencia de bases de nucleótidos[53].

Unidad Taxonómica Operativa

Es el término para referirse de manera práctica a un taxón que no está incluido en la definición exacta de especie[54].

3.4. Hipótesis

3.4.1. Hipótesis general

Existe diferencia entre las bacterias bucales en el microbioma salival de niños peruanos con caries y sin caries usando Tecnología de Oxford Nanopore.

3.4.2. Hipótesis especificas

- Existen diferencias significativas a nivel bacteriano de acuerdo a los *phylum* del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.
- Existen diferencias significativas a nivel bacteriano de acuerdo a los géneros del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.
- Existen diferencias significativas a nivel bacteriano de acuerdo a las especies del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.
- Existen diferencias significativas del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore, de niños peruanos con caries y sin caries.

3.5. Operacionalización de variable

Tipo de variable	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala	Valor
Cuantitativa	Microbioma bacteriano bucal	Comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten nuestro espacio corporal[8].	Caracterización de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos del microbioma oral.	Características a nivel *phylum*	– *Actinobacteria* – *Bacteroidetes* – *Chlamydiae* – *Chloroflexy* – *Firmicutes* – *Fusobacteria* – *Gracilibacteria* – *Proteobacteria* – *Saccharibacteria* – *Spirochaetes* – *SR1* – *Synergistetes*	De razón	Abundancia Relativa (%)

				Características a nivel género	– *Abiotrophia* – *Peptostreptococcus* – *Streptococcus* – *Stomatococcus* – *Actinomyces* – *Bifidobacterium* – *Corynebacterium* – *Eubacterium* – *Lactobacilus* – *Propionibacterium* – *Pseudoramibacter* – *Rothia* – *Moraxella* – *Neisseria* – *Veillonella:* – *Campylobacter*	De razón	Abundancia Relativa (%)

					– *Capnocytophaga* – *Desulfobacter* – *Desulfovibrio* – *Eikenella* – *Fusobacterium* – *Hemophilus* – *Leptotrichia* – *Prevotella* – *Selemonas* – *Simonsiella* – *Treponema* – *Wolinella*		

				Características a nivel especie	– *Streptococcus mutans* – *Streptococcus mitis* – *Streptococcus salivaius* – *Streptococcus oralis* – *Agregatibacter actinomycetemcomitans* – *Streptococcus parasanguinis* – *Escherichia coli* – *Streptococcus sanguinis* – *Staphylococcus aureus* – *Porphyromonas gingivalis* – *Haemophilus influenzae* – *Streptococcus pyogenes*	De Razón	Abundancia Relativa (%)

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

Tipo y diseño de investigación:

Descriptivo, observacional, transversal.

4.2. Población y muestra

4.2.1. Población

Niños peruanos de 8 a 10 años de edad de la ciudad de Lima, Perú.

Lima: Institución Educativa N° 3036 “José Andrés Rázuri”, niños de tercer, cuarto y quinto grado

4.2.2. Muestra

Para seleccionar la muestra se tuvo en cuenta el método no probabilístico intencionado por conveniencia, por lo que, se aplicó criterios de inclusión y exclusión, nuestra muestra fue de 30 niños peruanos de 8 a 10 años (15 niños con caries y 15 niños sin caries); y la saliva como unidad de análisis muestral.

4.2.2.1. Criterios de inclusión

- Niños peruanos de 8 a 10 años de edad, sin caries.
- Niños peruanos de 8 a 10 años de edad, que hayan aceptado voluntariamente y tengan el consentimiento firmado de sus padres o tutores legales.
- Niños peruanos de 8 a 10 años de edad, con diagnóstico previo de caries por índice ceod y CPOD.

4.2.2.2. Criterios de exclusión

- Niños peruanos de 0 a 7 años de edad.
- Niños de 8 a 10 años nacidos fuera de Perú.
- Niños peruanos de 8 a 10 años de edad, que no hayan aceptado voluntariamente y no tengan el consentimiento firmado de sus padres o tutores legales.
- Niños con lesiones que no sean caries dental o presenten enfermedad sistémica.

4.3. Procedimientos y Técnicas

Se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (N°039-CEI-FO-2024).

4.3.1. Procedimientos antes de la recolección de muestras biológicas

Se envió la carta de presentación dirigida a la directora de la institución educativa con el fin de dar a conocer el trabajo de investigación a realizar. Luego se hicieron las coordinaciones para definir la fecha y hora de visita a las aulas para la recolección de muestras biológicas de los niños entregando los consentimientos y asentimientos informados. De igual modo, se coordinó con el director y biólogos encargados del laboratorio del departamento de Genética y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la espera de la llegada de las muestras biológicas y su posterior conservación.

4.3.2. Recolección de muestras biológicas

Antes de empezar la recolección de saliva, se pidió a los participantes que se enjuaguen la boca con 10ml de agua por 60 seg., para eliminar todo tipo de restos de comida. Se les realizó la evaluación oral para obtener el diagnóstico previo de caries

dental, la ausencia o presencia de caries dental, la cantidad de piezas cariadas y se registró en la ficha de historia clínica (odontograma). Para la colecta, se pidió a los participantes que acumulen la saliva en su boca, para luego verterlo en un recipiente estéril, esto se dio hasta acumular una muestra de 5ml. Cada tubo fue rotulado de acuerdo al aula del niño y número de orden según la lista del aula, para la identificación y reconocimiento en las fichas de registro. Cada tubo se almacenó en un cooler adaptado con Ice Pack Gel para luego ser transportado de manera inmediata hacia el laboratorio.

4.3.3. Procedimientos en el laboratorio

Las muestras biológicas fueron llevadas al laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular y Genética; donde fueron guardadas a -20° hasta su procesamiento.

4.3.3.1. Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el kit Extracta Plus DNA, 50 RXN Cat. No. 95213-050 (Quantabio) respaldado por las instrucciones del fabricante. Además, se tuvo cuidado con mantener estéril el entorno e instrumental que se utilizó.

Se colocó la muestra en un microtubo de 1.5 ml. Antes de empezar, como tratamiento previo se preparó el buffer de lisis de lisozima (Tris-HCL 20 mM; pH 8,0 / EDTA de sodio 2mM / 1,2% Tritón® X-100 / inmediatamente antes de usar, se agregó lisozima hasta una concentración final de 20 mg/ml). Luego, se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 180 µl de tampón de lisis de lisozima. Se incubó a 37° al menos 30 min para luego retirarlo del ambiente a 37°. Seguidamente, se añadió 25 µl de Proteinasa K y 200 µl de Tampón EPDL y se mezcló mediante vórtex. Se incubó a 56° durante 30 min. Después, se agregó 200 µl de etanol

(EtOH) al 100% a la muestra y se mezcló mediante vórtex para obtener una solución homogénea.

Para unir y lavar el ADN, se ensambló la columna de centrifugación de ADN Extracta Plus por protocolo colocando la columna de centrifugación en el tubo de recolección de 2ml provisto. A continuación, se transfirió la mezcla de los pasos de pretratamiento a la columna de centrifugación y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Luego, se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recolección nuevo y se desechó el tubo de recolección usado y el flujo. Inmediatamente, se agregó 500 µl del buffer EPDW1 a la columna de centrifugación. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min y se colocó la columna de centrifugación en un tubo de recolección nuevo de 2 ml y se desechó el tubo de recolección usado y el flujo. Luego, se añadió 500 µl del buffer EPDW2 y centrifugó durante 3 min a 14000 rpm. Se tuvo en cuenta el tiempo prolongado para garantizar que todo el EtOH de la muestra se elimine y fluya.

Finalmente, se colocó la columna de centrifugación de ADN Extracta Plus en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml o 2 ml y se pipeteó 100 µl de tampón EPDE directamente sobre la membrana Extracta plus, para después incubarlo a temperatura ambiente durante 1 min y posteriormente se centrifugó durante 1 min a 8000 para eluir el ADN.

4.3.3.2. Preparación de la librería

Para la preparación de la librería de secuenciación se utilizó el kit 16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024) que tiene 24 Barcodes únicos, lo que permite agrupar hasta 24 muestras en una secuenciación; y también se tuvo cuidado con mantener estéril el entorno e instrumental que se utilizó.

Para empezar, se transfirió 15 µl de ADN genómico a el tubo ADN LoBind, se mezcló despacio mediante agitación para luego agregar 25 µl del taq polimerasa AccuStart II PCR ToughMix®. Posteriormente, con puntas de pipetas limpias en una pipeta multicanal, se perforó con cuidado la superficie de aluminio de los Barcodes 16S necesarios, se mezcló pipeteando 10 veces hacia arriba y hacia abajo; y se transfirió 10 µl de cada Barcode 16S a los tubos de la muestra. A continuación, se mezcló mediante vórtex, luego se le llevó a un minispin y después al Thermal Cycler con la temperatura y tiempo adecuados.

Inmediatamente, se transfirió el volumen completo a un nuevo tubo y a este, se transfirió 30 µl de perlas SparQ Pure Mg. Se llevó a agitar a través del Hula Mixer por 5 minutos y luego se llevó al spin. Mientras tanto, se preparó 500 µl de etanol al 70% en agua libre de nucleasas. Después, se retira el sobrenadante con una pipeta y se mantiene el *pellet*, para luego lavarlas 2 veces con 200 µl de etanol al 70%. Se llevó al spin y se retiró el sobrenadante excedente. Luego, se dejó secando por 30 seg y se transfirió 10 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + NaCl 50 mM para después dejarlo incubando por 2 min a temperatura ambiente; y después se llevó al spin. Se retiró 10 µl de lo eluido en un tubo Eppendorf DNA LoBind limpio de 1.5 ml y se desechó las perlas granuladas.

Finalmente, se transfirió 0.1 µl de cada tubo a uno nuevo, por lo cual se consiguió 24 µl (el total del primer grupo de muestra fue de 24) y de este último se transfirió 10 µl a un nuevo tubo; y se le llevó al spin. Se agregó 1 µl de RAP y se mezcló mediante *flicking* para después dejarlo incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.

4.3.3.3. Secuenciación genómica

Para realizar el secuenciamiento de nanoporos, se utilizó el secuanciador minION MK1B (modelo MIN-101B / fabricante Oxford Nanopore Technologies

plc. UK / proveedor Umbrella Genomics Company SAC) con las celdas de flujo Flonge (EXP-FSE001). Para preparar la mezcla de cebado de la celda de flujo, en un tubo Eppendorf DNA LoBind nuevo se mezcló 3 µl de Flush Tether (FLT) con 117 µl de Flush Buffer (FB).

Para preparar la celda de flujo con la mezcla de FLT y FB, no debió de existir un espacio de aire en el puerto de muestra de la celda de flujo ni en la punta de la pipeta. Se colocó el líquido de preparación en la celda de flujo Flonge pipeteando hacia abajo. De igual manera, para agregar la mezcla de secuenciación a la celda de flujo no debió existir un espacio de aire en el puerto de muestra ni en la punta de la pipeta. Se dispensó lentamente la mezcla de secuenciación en la celda de flujo pipeteando lentamente hacia abajo, se selló la celda de flujo Flonge y se tapó la plataforma de secuenciación.

4.4. Procesamiento de datos

Para procesar los datos de la secuenciación se utilizó el software independiente MinKNOW UI mediante el secuenciador MinION Mk1B con las celdas de flujo Flonge conectado a la laptop modelo Dell Inspiron 3593 RAM 15.8 GB disponible, mediante el puerto USB. Luego de configurar los parámetros de secuenciación para su ejecución como posición de la celda de flujo y la identificación de la muestra, se obtuvo los datos en archivos en formato FASTQ. En el portal EPI2ME se corrieron esos archivos mediante la opción wf-16s para identificar secuencias de 16S y se obtuvo los resultados en un archivo WinRAR.

4.5. Análisis de resultado

El informe se elaboró utilizando la plataforma epi2me-labs/wf-16s. Los resultados fueron generados automáticamente a través del programa del flujo de trabajo wf-16s nextflow v1.2.0 proporcionado por Oxford Nanopore Technologies en los cuales se

obtuvieron los resúmenes de muestras mediante el gráfico de código de barras, la taxonomía; y la cantidad y el porcentaje de sus abundancias relativas según *phylum,* género y especie en formato .csv (archivo de valores separados por comas) que fueron convertidos a formato hoja de cálculo de Excel. Para el análisis del resultado final se utilizó el análisis descriptivo mediante la prueba T de Student.

V. RESULTADOS

5.1. Presencia de caries y conteo de piezas dentales con caries

Luego de evaluar la ficha de recolección de datos correspondiente a la evaluación oral para el diagnóstico previo de caries dental, se determinó quienes fueron los niños que tenían y no tenían presencia de caries; así también se realizó la cuantificación de las piezas dentales con caries de los niños que tenían presencia de la misma, detallado en la Tabla 3.

Tabla 3. Presencia de caries y cantidad de piezas dentales con caries

Muestra	Código	Presencia de caries	Cantidad de piezas dentales con caries
Niño N°1	Barcode01	No	0
Niño N°2	Barcode02	Si	5
Niño N°3	Barcode03	No	0
Niño N°4	Barcode04	Si	3
Niño N°5	Barcode05	No	0
Niño N°6	Barcode06	Si	6
Niño N°7	Barcode07	No	0
Niño N°8	Barcode13	Si	2

Niño N°9	Barcode14	No	0
Niño N°10	Barcode15	Si	4
Niño N°11	Barcode16	No	0
Niño N°12	Barcode17	Si	3
Niño N°13	Barcode18	Si	6
Niño N°14	Barcode19	Si	4
Niño N°15	Barcode20	Si	4
Niño N°16	Barcode21	No	0
Niño N°17	Barcode22	No	0
Niño N°18	Barcode23	Si	5
Niño N°19	Barcode24	No	0
Niño N°20	Barcode01’	No	0
Niño N°21	Barcode02’	No	0
Niño N°22	Barcode03’	Si	4
Niño N°23	Barcode04’	No	0
Niño N°24	Barcode05’	No	0
Niño N°25	Barcode06’	No	0
Niño N°26	Barcode07’	Si	5
Niño N°27	Barcode08’	Si	2
Niño N°28	Barcode09’	No	0
Niño N°29	Barcode10’	Si	7
Niño N°30	Barcode11’	Si	5

5.2. Registro y codificación de las muestras

A continuación, se presenta los códigos por cada paciente detallado en la Tabla 4.

En total fueron 30 niños por lo cual se obtuvo 30 tubos con muestras biológicas.

La codificación del tubo se llenó de la siguiente manera:

Aula del niño / Número de orden del niño

En consecuencia, desde el niño N°1 hasta el niño N°10 les pertenecen los tubos que empiezan con el código 3ª por ser del 3° grado; desde el niño N° 11 hasta el niño N° 20 les pertenecen los tubos que empiezan con el código 4ª por ser del 4° grado y desde el niño N° 21 hasta el niño N° 30 le pertenecen los tubos que empiezan con el código 5ª y 5B por ser del 5° grado.

Los códigos obtenidos luego del secuenciamiento de las muestras se denominaron Barcode. Debido a que el secuenciamiento solo se pudo realizar en grupos de 24 muestras, el primer grupo llega hasta el Barcode24, pero no se tomaron en cuenta los Barcode08 hasta el Barcode12 por ser parte de otra investigación y el segundo grupo empieza en Barcode01' hasta completar con el Barcode11'; en este segundo grupo se agregó el signo (') para diferenciarlos del primer grupo. Desde el niño N°1 hasta el niño N°7 le corresponden a cada uno el Barcode correlativamente del 01 al 07, desde el niño N° 8 hasta el niño N°19 le corresponden desde el Barcode13 hasta el Barcode24 y desde el niño N°20 hasta el niño N°30 le corresponden desde el Barcode01' hasta el Barcode11'.

Tabla 4. Codificación de las 30 muestras

Muestra	Código del tubo	Código de las muestras luego del secuenciamiento
Niño N°1	3A03	Barcode01
Niño N°2	3A06	Barcode02
Niño N°3	3A08	Barcode03
Niño N°4	3A15	Barcode04

Niño N°5	3A17	Barcode05
Niño N°6	3A20	Barcode06
Niño N°7	3A22	Barcode07
Niño N°8	3A23	Barcode13
Niño N°9	3A25	Barcode14
Niño N°10	3A26	Barcode15
Niño N°11	4A01	Barcode16
Niño N°12	4A06	Barcode17
Niño N°13	4A07	Barcode18
Niño N°14	4A12	Barcode19
Niño N°15	4A13	Barcode20
Niño N°16	4A15	Barcode21
Niño N°17	4A16	Barcode22
Niño N°18	4A22	Barcode23
Niño N°19	4A28	Barcode24
Niño N°20	4A29	Barcode01’
Niño N°21	5A01	Barcode02’
Niño N°22	5A05	Barcode03’
Niño N°23	5A09	Barcode04’
Niño N°24	5A13	Barcode05’
Niño N°25	5A18	Barcode06’
Niño N°26	5A20	Barcode07’
Niño N°27	5B08	Barcode08’
Niño N°28	5B09	Barcode09’
Niño N°29	5B18	Barcode10’
Niño N°30	5B20	Barcode11’

5.3. Composición taxonómica del microbioma salival

Tabla 5. Abundancia relativa a nivel *phylum* en el total de las muestras de saliva

Phylum	**Barcode01**	**Barcode02**	**Barcode03**	**Barcode04**	**Barcode05**	**Barcode06**	**Barcode07**	**Barcode13**	**Barcode14**	**Barcode15**	**Barcode16**	**Barcode17**	**Barcode18**	**Barcode19**	**Barcode20**
Firmicutes	61	268	81	389	757	782	669	513	505	267	116	334	429	666	666
Unknown	230	294	149	114	350	316	294	160	186	107	55	128	168	250	203
Proteobacteria	152	145	201	3	14	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Bacteroidota	6	60	7	5	2	5	6	10	21	1	0	7	3	0	5
Actinobacteria	0	4	1	2	1	2	4	0	4	3	1	3	3	3	0
Fusobacteria	5	7	15	1	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0

Barcode21	**Barcode22**	**Barcode23**	**Barcode24**	**Barcode01'**	**Barcode02'**	**Barcode03'**	**Barcode04'**	**Barcode05'**	**Barcode06'**	**Barcode07'**	**Barcode08'**	**Barcode09'**	**Barcode10'**	**Barcode11'**	**Total**	**Abundancia Relativa (%)**
89	654	252	696	136	107	114	78	161	141	107	158	127	121	58	9502	64.90
66	250	162	208	40	45	53	75	64	49	53	87	57	67	57	4337	29.62
0	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	524	3.58
0	1	13	0	0	2	0	6	1	2	0	1	3	0	3	170	1.16
4	16	8	1	3	0	1	1	0	3	1	1	0	0	1	71	0.48
0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	37	0.25
															14641	

La tabla 5 muestra la abundancia relativa a nivel *phylum* en las 30 muestras. Se observa 5 tipos de *phylum* conocidos, además de un gran grupo de *phylum* unknown que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos. En el conteo general de los barcodes, la cantidad total de *phylum* encontrado fue de 14641. Los *phylum* que predominan son *Firmicutes* (60.94%) y luego *phylum* unknown (29.62%). Luego, están *Proteobacteria* (3.58%), *Bacteroidota* (1.16%), *Actinobacteria* (0.48%) y *Fusobacteria* (0.25%).

Tabla 6. Abundancia Relativa a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con presencia de caries

Phylum	**Barcode02**	**Barcode04**	**Barcode06**	**Barcode13**	**Barcode15**	**Barcode17**	**Barcode18**	**Barcode19**	**Barcode20**	**Barcode23**	**Barcode03'**	**Barcode07'**	**Barcode08'**	**Barcode10'**	**Barcode11'**	**Total**	**Abundancia Relativa (%)**
Firmicutes	268	389	782	513	267	334	429	666	666	252	114	107	158	121	58	5124	35.00
Unknown	294	114	316	160	107	128	168	250	203	162	53	53	87	67	57	2219	15.16
Proteobacteria	145	3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	152	1.04
Bacteroidota	60	5	5	10	1	7	3	0	5	13	0	0	1	0	3	113	0.77
Actinobacteria	4	2	2	0	3	3	3	3	0	8	1	1	1	0	1	32	0.22
Fusobacteria	7	1	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	0	14	0.10
																7654	

La tabla 6 muestra la abundancia relativa a nivel *phylum* en las 15 muestras de saliva de niños identificados con presencia de caries. Según el conteo general de los barcodes, la cantidad total de *phylum* encontrado en estas muestras fue de 7654. Los *phylum* que predominan son *Firmicutes* (35%) y luego *phylum* Unknown (15.16%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos. Luego, están *Proteobacteria* (1.04%), *Bacteroidota* (0.77%), *Actinobacteria* (0.22%) y *Fusobacteria* (0.10%).

Tabla 7. Abundancia Relativa a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños sin presencia de caries

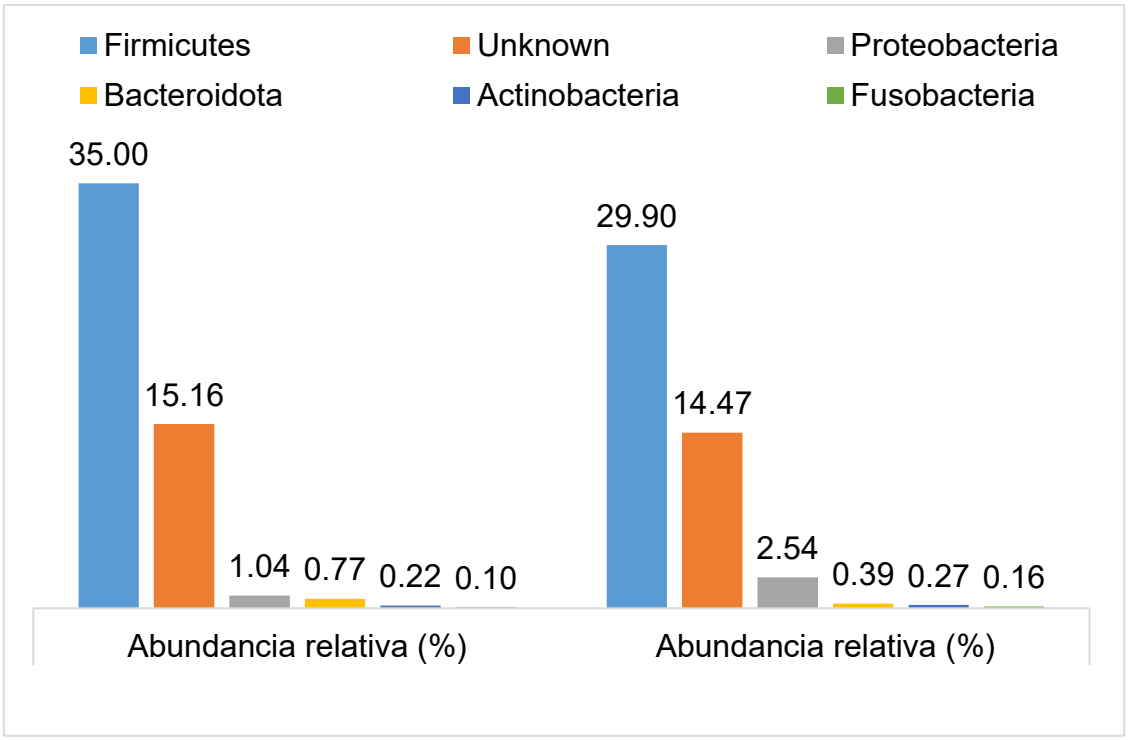
Phylum	**Barcode01**	**Barcode03**	**Barcode05**	**Barcode07**	**Barcode14**	**Barcode16**	**Barcode21**	**Barcode22**	**Barcode24**	**Barcode01'**	**Barcode02'**	**Barcode04'**	**Barcode05'**	**Barcode06'**	**Barcode09'**	**Total**	**Abundancia Relativa (%)**
Firmicutes	61	81	757	669	505	116	89	654	696	136	107	78	161	141	127	4378	29.90
Unknown	230	149	350	294	186	55	66	250	208	40	45	75	64	49	57	2118	14.47
Proteobacteria	152	201	14	1	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	372	2.54
Bacteroidota	6	7	2	6	21	0	0	1	0	0	2	6	1	2	3	57	0.39
Actinobacteria	0	1	1	4	4	1	4	16	1	3	0	1	0	3	0	39	0.27
Fusobacteria	5	15	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	23	0.16
																6987	

La tabla 7 muestra la abundancia relativa a nivel *phylum* en las 15 muestras de saliva de niños identificados sin presencia de caries. Según el conteo general de los barcodes, la cantidad total de *phylum* encontrado en estas muestras fue de 6987. Los *phylum* que predominan son *Firmicutes* (29.90%) y luego *phylum* Unknown (14.47%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos. Luego, están *Proteobacteria* (2.54%), *Bacteroidota* (0.39%), *Actinobacteria* (0.27%) y *Fusobacteria* (0.16%).

Tabla 8. Diferencias a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con caries y sin caries

Phylum	Con caries		Sin caries		Valor de *p*
	N	Abundancia relativa (%)	N	Abundancia relativa (%)	
Firmicutes	5124	35.00	4378	29.90	0.000
Unknown	2219	15.16	2118	14.47	0.083
Proteobacteria	152	1.04	372	2.54	0.000
Bacteroidota	113	0.77	57	0.39	0.000
Actinobacteria	32	0.22	39	0.27	0.235
Fusobacteria	14	0.10	23	0.16	0.098

Gráfico 1. Diferencias a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con caries y sin caries



En la tabla 8 y en el gráfico 1 se muestran las diferencias encontradas a nivel *phylum* en muestras de saliva de niños con caries y sin caries. Del total de *phylum* (14641), los *phylum* encontrados en muestras de niños con caries (52.28%) fueron más abundantes que los *phylum* encontrados en muestras de niños sin caries (47.72%). Los *Firmicutes* (35%), *phylum* Unknown (15.16%) y *Bacteroidota* (0.77%) son más abundantes en las muestras de saliva niños con caries que en las muestras saliva de niños sin caries; y los *Proteobacteria* (2.54%), *Actinobacteria* (0.27%) y *Fusobacteria* (0.16%) son más abundantes en las muestras de saliva niños sin caries que en las muestras de saliva niños con caries. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los *Firmicute, Proteobacteria* y *Bacteroidota.*

Tabla 9. Abundancia relativa a nivel género en el total de las muestras de saliva

Género	Barcode01	Barcode02	Barcode03	Barcode04	Barcode05	Barcode06	Barcode07	Barcode13	Barcode14	Barcode15	Barcode16	Barcode17	Barcode18	Barcode19	Barcode20
Streptococcus	51	82	43	375	685	737	614	499	488	224	104	308	411	615	633
Unknown	230	294	149	114	350	316	294	160	186	107	55	128	168	250	203
Granulicatella	3	14	3	8	52	22	20	5	6	19	6	14	10	20	15
Haemophilus	91	44	182	2	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Veillonella	1	129	25	2	2	11	12	1	3	3	1	4	1	1	10
Neisseria	50	96	18	0	5	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Prevotella	5	53	7	5	1	4	3	10	17	1	0	7	3	0	3
Gemella	1	7	2	2	13	3	7	1	3	12	2	4	3	17	2
Rothia	0	0	1	1	1	0	3	0	2	3	1	2	3	2	0
Fusobacterium	5	6	14	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
Abiotrophia	0	3	0	0	1	1	10	0	0	0	1	0	0	3	0
Peptostreptococcus	1	4	2	0	0	3	2	1	0	3	1	0	0	2	0
Oribacterium	2	4	0	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	2
Porphyromonas	1	5	0	0	1	1	2	0	3	0	0	0	0	0	2
Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis	0	6	3	0	0	0	1	1	1	2	0	0	1	0	0
Lachnoanaerobaculum	0	4	1	0	2	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0
Mogibacterium	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	1	2	2	0
Solobacterium	0	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	2	1
Megasphaera	0	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Aggregatibacter	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schaalia	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Selenomonas	1	4	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0
Corynebacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lancefieldella	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Parvimonas	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Campylobacter	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leptotrichia	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Actinomyces	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Morococcus	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Capnocytophaga	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Alloprevotella	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterococcus	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Vagococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Filifactor	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Pseudoleptotrichia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Barcode21	Barcode22	Barcode23	Barcode24	Barcode01'	Barcode02'	Barcode03'	Barcode04'	Barcode05'	Barcode06'	Barcode07'	Barcode08'	Barcode09'	Barcode10'	Barcode11'	Total (N)	Abundancia Relativa (%)
77	530	217	693	134	101	110	73	148	134	104	150	124	117	51	8632	58.99
66	250	162	208	40	45	53	75	64	49	53	87	57	67	57	4337	29.64
3	117	14	2	0	5	2	1	3	4	2	1	2	1	4	378	2.58
0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	332	2.27
0	0	7	0	0	0	0	0	2	0	1	5	0	0	1	222	1.52
0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	174	1.19
0	0	12	0	0	2	0	5	1	1	0	0	1	0	3	144	0.98
2	2	7	0	0	0	1	0	2	3	0	0	1	1	0	98	0.67
3	14	3	0	3	0	0	1	0	3	1	1	0	0	0	48	0.33
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	31	0.21
0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	25	0.17
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	23	0.16
5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	22	0.15
0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	20	0.14
0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	19	0.13
0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	18	0.12
1	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	17	0.12
0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	13	0.09
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.08
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.06
1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.06
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	9	0.06
0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0.02
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
															14634	

La tabla 9 muestra la abundancia relativa a nivel género en las 30 muestras. Se observa 35 tipos de géneros conocidos, además de un gran grupo de géneros unknown que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos. En el conteo general de los barcodes, la cantidad total de géneros encontrados fue de 14634. Los géneros que predominan son *Streptococcus* (58.99%), géneros unknown (29,64%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Granulicatella* (2.58%), *Haemophilus* (2.27%), *Veillonella* (1.52%) y *Neisseria* (1.19%). Luego, están *Prevotella, Gemella, Rothia, Fusobacterium, Abiotrophia, Peptostreptococcus, Oribacterium, Porphyromonas, Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis, Lachnoanaerobaculum, Mogibacterium, Solobacterium, Megasphaera, Aggregatibacter, Schaalia, Selenomonas, Corynebacterium, Lancefieldella, Parvimonas, Campylobacter, Leptotrichia, Actinomyces, Morococcus, Capnocytophaga, Alloprevotella, Enterococcus, Vagococcus, Filifactor, Pseudoleptotrichia* y *Staphylococcus,* todos en ese orden con menos del 1%.

Tabla 10. Abundancia relativa a nivel género en muestras de saliva de niños con presencia de caries

Género	Barcode02	Barcode 04	Barcode 06	Barcode 13	Barcode 15	Barcode 17	Barcode 18	Barcode 19	Barcode 20	Barcode 23	Barcode 3'	Barcode 7'	Barcode 8'	Barcode 10'	Barcode 11'	Total (N)	Abundancia relativa (%)
Streptococcus	82	375	737	499	224	308	411	615	633	217	110	104	150	117	51	4633	31.66
Unknown	294	114	316	160	107	128	168	250	203	162	53	53	87	67	57	2219	15.16
Veillonella	129	2	11	1	3	4	1	1	10	7	0	1	5	0	1	176	1.20
Granulicatella	14	8	22	5	19	14	10	20	15	14	2	2	1	1	4	151	1.03
Prevotella	53	5	4	10	1	7	3	0	3	12	0	0	0	0	3	101	0.69
Neisseria	96	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	98	0.67
Gemella	7	2	3	1	12	4	3	17	2	7	1	0	0	1	0	60	0.41
Haemophilus	44	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	48	0.33
Rothia	0	1	0	0	3	2	3	2	0	3	0	1	1	0	0	16	0.11
Peptostreptococcus	4	0	3	1	3	0	0	2	0	1	0	0	1	0	1	16	0.11
Lachnoanaerobaculum	4	0	0	2	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	12	0.08
Fusobacterium	6	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	11	0.08

Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis	6	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	11	0.08
Mogibacterium	0	1	0	2	0	1	2	2	0	2	0	0	0	1	0	11	0.08
Oribacterium	4	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	10	0.07
Solobacterium	1	0	3	0	0	1	0	2	1	2	0	0	0	0	0	10	0.07
Megasphaera	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.07
Abiotrophia	3	0	1	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	9	0.06
Porphyromonas	5	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	9	0.06
Selenomonas	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Corynebacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0.03
Lancefieldella	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Schaalia	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0.02
Parvimonas	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Leptotrichia	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Actinomyces	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Morococcus	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Alloprevotella	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Enterococcus	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01

Aggregatibacter	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Campylobacter	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Capnocytophaga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.01
Vagococcus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Filifactor	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Pseudoleptotrichia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.01
Staphylococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.01
																7649	

La tabla 10 muestra la abundancia relativa a nivel género en las 15 muestras de saliva de niños identificados con presencia de caries. Según el conteo general de los barcodes, la cantidad total de género encontrado en estas muestras fue de 7649. Los géneros que predominan son *Streptococcus* (31.66%) y luego géneros unknown (15.16%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Veillonella* (1.20%) y *Granulicatella* (1.03%). Luego, están *Prevotella, Neisseria, Gemella, Haemophylus, Rothia, Peptostreptococcus. Lachnoanaerobaculum, Fusobacterium, Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis, Mogibacterium, Oribacterium, Solobacterium, Megasphaera, Abiotrophia, Porphyromonas, Selenomonas, Corynebacterium, Lancefieldella, Schaalia, Parvimonas, Leptotrichia, Actinomyces, Morococcus, Alloprevotella, Enterococcus, Aggregatibacter, Campylobacter, Capnocytophaga, Vagococcus, Filifactor, Pseudoleptotrichia y Staphylococcus,* todos en ese orden con menos de 1%.

Tabla 11. Abundancia relativa a nivel género en muestras de saliva de niños sin presencia de caries

Género	Barcode 01	Barcode 03	Barcode 05	Barcode 07	Barcode 14	Barcode 16	Barcode 21	Barcode 22	Barcode 24	Barcode 01'	Barcode 02'	Barcode 04'	Barcode 05'	Barcode 06'	Barcode 09'	Total (N)	Abundancia relativa (%)
Streptococcus	51	43	685	614	488	104	77	530	693	134	101	73	148	134	124	3999	27.33
Unknown	230	149	350	294	186	55	66	250	208	40	45	75	64	49	57	2118	14.47
Haemophilus	91	182	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	284	1.94
Granulicatella	3	3	52	20	6	6	3	117	2	0	5	1	3	4	2	227	1.55
Neisseria	50	18	5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	76	0.52
Veillonella	1	25	2	12	3	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	46	0.31
Prevotella	5	7	1	3	17	0	0	0	0	0	2	5	1	1	1	43	0.29
Gemella	1	2	13	7	3	2	2	2	0	0	0	0	2	3	1	38	0.26
Rothia	0	1	1	3	2	1	3	14	0	3	0	1	0	3	0	32	0.22
Fusobacterium	5	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	20	0.14
Abiotrophia	0	0	1	10	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	16	0.11
Oribacterium	2	0	1	3	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	12	0.08

Porphyromonas	1	0	1	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	11	0.08
Aggregatibacter	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	8	0.05
Peptostreptococcus	1	2	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.05
Lachnoanaerobaculum	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	6	0.04
Mogibacterium	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	6	0.04
Schaalia	0	0	0	0	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Selenomonas	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0.03
Campylobacter	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Solobacterium	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0.02
Capnocytophaga	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Leptotrichia	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0.01
Parvimonas	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0.01
Actinomyces	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Filifactor	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Megasphaera	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Morococcus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01

Pseudoleptotrichia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Vagococcus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
																6985	

La tabla 11 muestra la abundancia relativa del microbioma oral a nivel género en las 15 muestras de niños identificados sin presencia de caries. Según el conteo general de los barcodes, la cantidad total de género encontrado en estas muestras fue de 6985. Los géneros que predominan son *Streptococcus* (27.33%), géneros unknown (14.47%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Haemophilus* (1.94%) y *Granulicatella* (1.55%). Luego, están *Neisseria, Veillonella, Prevotella, Gemella, Rothia, Fusobacterium, Abiotrophia, Oribacterium, Porphyromonas, Aggregatibacter, Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis, Peptostreptococcus, Lachnoanaerobaculum, Mogibacterium, Schaalia, Selenomonas, Campylobacter, solobacterium, Capnocytophaga, Leptotrichia, Parvimonas, Actinomyces, Filifactor, Morococcus, Pseudoleptotrichia y Vagococcus,* todos en ese orden con menos de 1%.

Tabla 12. Diferencias a nivel género en muestras de saliva de niños con caries y sin caries

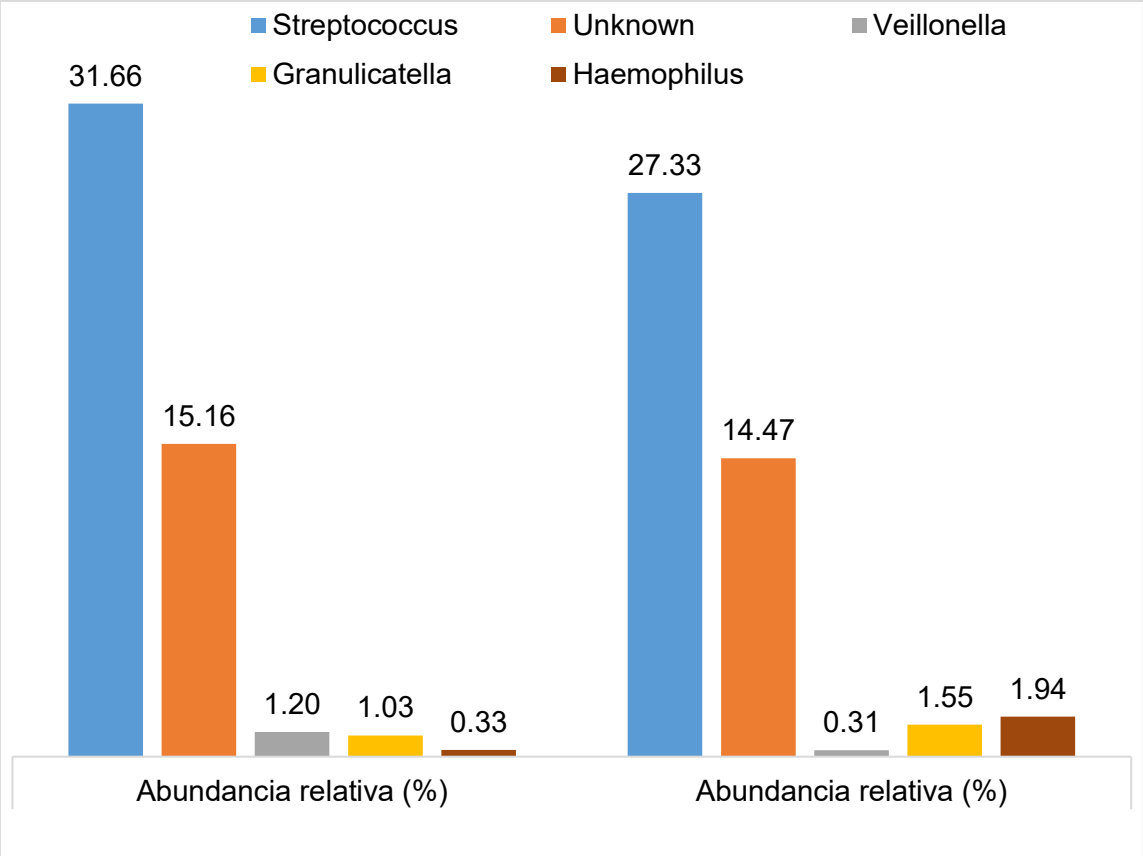
Género	Con caries		Sin caries		Valor de *p*
	N	Abundancia relativa (%)	N	Abundancia relativa (%)	
Streptococcus	4633	31.66	3999	27.33	0.000
Unknown	2219	15.16	2118	14.47	0.099
Veillonella	176	1.20	46	0.31	0.000
Granulicatella	151	1.03	227	1.55	0.000
Haemophilus	48	0.33	284	1.94	0.000
Prevotella	101	0.69	43	0.29	0.000
Neisseria	98	0.67	76	0.52	0.110
Gemella	60	0.41	38	0.26	0.033
Rothia	16	0.11	32	0.22	0.030
Peptostreptococcus	16	0.11	7	0.05	0.095
Lachnoanaerobaculum	12	0.08	6	0.04	0.238
Fusobacterium	11	0.08	20	0.14	0.151
Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae_sedis	11	0.08	8	0.05	0.646
Mogibacterium	11	0.08	6	0.04	0.332
Oribacterium	10	0.07	12	0.08	0.831
Solobacterium	10	0.07	3	0.02	0.096
Megasphaera	10	0.07	1	0.01	0.015
Abiotrophia	9	0.06	16	0.11	0.230
Porphyromonas	9	0.06	11	0.08	0.823
Selenomonas	5	0.03	4	0.03	1.000
Corynebacterium	5	0.03	0	0.00	0.073
Lancefieldella	5	0.03	0	0.00	0.074
Schaalia	3	0.02	6	0.04	0.505

Parvimonas	3	0.02	2	0.01	1.000
Leptotrichia	2	0.01	2	0.01	1.000
Actinomyces	2	0.01	1	0.01	1.000
Morococcus	2	0.01	1	0.01	1.000
Alloprevotella	2	0.01	0	0.00	0.479
Enterococcus	2	0.01	0	0.00	0.479
Filifactor	1	0.01	1	0.01	1.000
Pseudoleptotrichia	1	0.01	1	0.01	1.000
Staphylococcus	1	0.01	0	0.00	1.000
Aggregatibacter	1	0.01	8	0.05	0.046
Campylobacter	1	0.01	3	0.02	0.617
Capnocytophaga	1	0.01	2	0.01	1.000
Vagococcus	1	0.01	1	0.01	1.000

En la tabla 12 se muestran las diferencias encontradas a nivel género en muestras de saliva de niños con caries y sin caries. Del total de géneros (14634), los géneros encontrados en muestras de niños con caries (52.27%) fueron más abundantes que los géneros encontrados en muestras de niños sin caries (47.73%). Los *Streptococcus,* géneros unknown que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Veillonella, Neisseria, Prevotella, Gemella, Peptostreptococcus, Lachnoanaerobaculum, Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis_Incertae, Mogibacterium, Solobacterium, Megasphaera, Selenomonas, Corynebacterium, Lancefieldella, Parvimonas, Actinomyces, Morococcus, Alloprevotella, Enterococcus* y *Staphylococcus* son más abundantes en las muestras de saliva niños con caries que en las muestras de saliva de niños sin caries. Los *Granulicatella, Haemophilus, Rothia, Fusobacterium, Oribacterium, Abiotrophia, Porphyromonas, Schaalia, Agregatibacter, Campylobacter* y *Capnocytophaga* son más abundantes en las muestras de saliva de niños sin caries que en las muestras de saliva de niños con caries. Los *Leptotrichia,*

Vagococcus, Filifactor y *Pseudoleptotrichia* se encuentran en mismo porcentaje de abundancia en ambos tipos de muestras. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los *Haemophilus, Veillonella, Streptococcus, Prevotella, Granulicatella, Megasphaera, Rothia, Gemella* y *Aggregatibacter.*

Gráfico 2. Diferencias a nivel género en muestras de saliva de niños con caries y sin caries



En el gráfico 2 se muestra las diferencias encontradas a nivel género en muestras de saliva de niños con caries y sin caries. Los *Streptococcus* (31.66%), géneros unknown (15.16%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos y *Veillonella* (1.20%), son más abundantes en las muestras de saliva de niños con caries que en las muestras de niños sin caries. En las muestras de saliva de niños sin caries son más abundantes los *Granulicatella* (1.55%) y *Haemophilus* (1.94%), que en las muestras de saliva de niños con caries.

Tabla 13. Abundancia relativa a nivel especie en el total de las muestras de saliva

Especies	Barcode01	Barcode02	Barcode03	Barcode04	Barcode05	Barcode06	Barcode07	Barcode13	Barcode14	Barcode15	Barcode16	Barcode17	Barcode18	Barcode19	Barcode20	Barcode21	Barcode22	Barcode23	Barcode24	Barcode01'	Barcode02'	Barcode03'	Barcode04'	Barcode05'	Barcode06'	Barcode07'	Barcode08'	Barcode09'	Barcode10'	Barcode11'	Total (N)	Abundancia Relativa (%)
Unknown	230	294	149	114	350	316	294	160	186	107	55	128	168	250	203	66	250	162	208	40	45	53	75	64	49	53	87	57	67	57	4337	29.69
Streptococcus salivarius	1	12	1	159	300	353	209	344	86	69	40	160	160	305	509	23	21	40	618	103	43	53	57	98	75	71	59	100	53	38	4160	28.48
Streptococcus parasanguinis	2	7	4	76	88	28	78	42	32	18	12	55	78	96	56	5	31	33	23	10	6	8	3	15	19	7	8	0	2	3	845	5.79
Streptococcus oralis	10	13	9	15	67	57	86	34	57	22	9	17	30	36	17	6	81	37	9	0	11	15	3	5	10	5	39	3	10	4	717	4.91
Streptococcus mitis	12	14	12	20	23	20	60	9	92	21	9	8	14	27	5	1	63	16	3	2	6	2	4	7	6	1	8	3	4	1	473	3.24
Streptococcus infantis	7	3	3	15	49	44	24	7	63	12	8	1	12	14	10	12	106	10	2	0	12	12	0	3	3	2	3	2	18	2	459	3.14
Streptococcus rubneri	2	0	3	5	32	45	18	7	46	5	4	9	17	13	5	10	56	10	6	3	9	5	1	4	4	0	7	0	9	0	335	2.29
Haemophilus parainfluenzae	85	41	179	2	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	320	2.19
Granulicatella adiacens	1	4	2	7	51	22	17	5	5	17	4	14	7	16	15	3	69	12	2	0	5	2	1	3	4	2	1	2	1	4	298	2.04
Streptococcus timonensis	6	6	0	6	6	17	28	0	16	4	3	3	9	25	1	0	49	10	0	0	3	4	1	0	2	2	1	1	3	1	207	1.42
Streptococcus australis	0	0	2	3	13	33	10	8	16	2	1	6	6	7	4	3	32	4	5	0	0	0	1	1	1	1	3	6	3	0	171	1.17
Streptococcus sanguinis	4	1	3	18	13	21	15	11	7	7	3	7	7	12	2	1	11	6	2	1	0	1	0	0	1	4	8	0	3	0	169	1.16
Streptococcus toyakuensis	1	12	2	5	9	9	23	3	11	14	3	13	4	8	3	1	15	14	1	3	0	0	0	1	2	0	3	0	0	0	160	1.10
Streptococcus vulneris	3	2	2	12	11	15	4	2	14	14	1	3	3	10	0	0	17	6	2	3	1	3	0	3	1	0	1	3	3	0	139	0.95
Streptococcus vestibularis	0	0	0	6	5	10	6	14	2	3	2	5	6	18	12	2	0	4	10	1	5	5	1	6	1	7	2	2	2	1	138	0.94
Streptococcus ilei	0	1	1	4	27	31	9	2	12	5	4	5	4	5	0	3	11	3	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	3	0	136	0.93
Neisseria perflava	41	68	17	0	4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	134	0.92
Streptococcus cristatus	1	1	0	13	6	7	13	4	5	7	2	7	22	8	1	2	10	0	0	4	0	0	0	1	0	2	0	0	2	0	118	0.81
Streptococcus koreensis	1	0	0	0	13	31	7	5	10	4	1	2	2	6	1	4	12	4	4	0	1	2	0	1	1	0	6	0	0	0	118	0.81
Granulicatella elegans	2	10	1	1	1	0	3	0	1	2	2	0	3	4	0	0	47	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	79	0.54
Prevotella melaninogenica	3	27	3	0	1	2	2	5	8	0	0	6	3	0	1	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	71	0.49
Veillonella atypica	0	48	5	0	0	0	4	1	3	0	0	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	70	0.48
Streptococcus gordonii	0	0	0	5	5	2	0	1	0	4	1	0	19	10	0	2	0	10	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	62	0.42
Veillonella dispar	0	35	5	1	1	2	3	0	0	2	0	2	1	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	60	0.41
Veillonella nakazawae	0	40	4	0	1	2	3	0	0	1	0	0	0	1	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	58	0.40
Streptococcus lactarius	0	0	0	8	8	4	0	3	2	0	0	2	5	6	3	1	0	4	1	0	2	0	0	0	4	0	0	0	2	0	55	0.38
Streptococcus downii	1	2	1	0	4	3	7	1	4	2	0	3	5	2	0	0	7	2	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	49	0.34
Gemella sanguinis	0	2	1	1	11	2	2	1	2	4	2	3	1	1	1	2	0	6	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	1	0	47	0.32
Rothia mucilaginosa	0	0	1	1	1	0	3	0	2	3	1	2	3	2	0	2	14	3	0	3	0	0	1	0	3	1	1	0	0	0	47	0.32
Streptococcus pseudopneumoniae	0	3	0	1	1	1	11	0	3	5	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	0.20
Prevotella histicola	0	4	1	3	0	1	1	4	2	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	1	0	3	1	1	0	0	0	0	1	27	0.18

Abiotrophia defectiva	0	3	0	0	1	1	10	0	0	0	1	0	0	3	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	25	0.17
Gemella haemolysans	0	3	0	1	2	0	2	0	1	3	0	1	1	8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0.16
Peptostreptococcus stomatis	1	4	2	0	0	3	2	1	0	3	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	22	0.15
[Eubacterium] sulci	0	6	3	0	0	0	1	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	19	0.13
Veillonella parvula	1	1	9	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0.12
Porphyromonas pasteri	1	5	0	0	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	17	0.12
Prevotella pallens	0	10	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	17	0.12
Gemella taiwanensis	0	2	0	0	0	1	3	0	0	4	0	0	1	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.11
Streptococcus gwangjuense	0	3	0	1	2	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.11
Prevotella jejuni	0	9	0	1	0	0	0	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0.10
Fusobacterium pseudoperiodonticum	2	3	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.10
Neisseria subflava	2	11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.10
Mogibacterium neglectum	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	2	2	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	13	0.09
Solobacterium moorei	0	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	13	0.09
Streptococcus thermophilus	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	13	0.09
Lachnoanaerobaculum orale	0	3	0	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	12	0.08
Megasphaera micronuciformis	0	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.08
Fusobacterium periodonticum	2	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.07
Streptococcus mutans	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.07
Streptococcus shenyangsis	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	10	0.07
Haemophilus sputorum	5	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.06
Neisseria macacae	0	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.06
Oribacterium parvum	1	2	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.06
Schaalia odontolytica	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.06
Neisseria mucosa	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Oribacterium asaccharolyticum	1	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Streptococcus intermedius	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Veillonella rogosae	0	0	1	0	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	8	0.05
Gemella morbillorum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	7	0.05
Oribacterium sinus	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	7	0.05
Fusobacterium nucleatum	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6	0.04
Lachnoanaerobaculum gingivalis	0	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Prevotella vespertina	0	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Streptococcus pneumoniae	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	6	0.04
Streptococcus symci	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Veillonella massiliensis	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	6	0.04
Aggregatibacter aphrophilus	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03

Corynebacterium argentoratense	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Lancefieldella parvula	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Streptococcus chosunense	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Aggregatibacter kilianii	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Campylobacter concisus	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Selenomonas felix	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Streptococcus anginosus	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Streptococcus periodonticum	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Veillonella infantium	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Leptotrichia wadei	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Morococcus cerebrosus	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Neisseria elongata	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Neisseria sicca	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Parvimonas micra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Prevotella salivae	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Acinetobacter junii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	3	0.02
Campylobacter massiliensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	3	0.02
Actinomyces naeslundii	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Alloprevotella rava	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Filifactor alocis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Gemella parahaemolysans	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Haemophilus parahaemolyticus	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Neisseria cinerea	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Parvimonas parva	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Porphyromonas endodontalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Pseudoleptotrichia goodfellowii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Streptococcus constellatus	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Vagococcus coleopterorum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Mogibacterium vescum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
																															14606	

La tabla 13 muestra la abundancia relativa a nivel especies en las 30 muestras. Se observa 96 tipos de especies, además de un gran grupo de especies unknown que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos. En el conteo general de los barcodes, la cantidad total de especies encontrado fue de 14606. Las especies que predominan son géneros unknown (29.69%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Streptococcus salivarius* (28.48%), *Streptococcus parasanguinis* (5.79%), *Streptococcus oralis* (4.91%), *Streptococcus mitis* (3.24%), *Streptococcus infantis* (3.14%), *Streptococcus rubneri* (2.29%), *Haemophilus parainfluenzae* (2.19%), *Granulicatella adiacens* (2.04%), *Streptococcus timonensus* (1.42%), *Streptococcus australis* (1.17%), *Streptococcus sanguinis* (1.16%) *y Streptococcus toyakuensis* (1.10%). Luego, están *Streptococcus vulneris, Streptococcus vestibularis, Streptococcus ilei, Neisseria perflava, Streptococcus cristatus, Streptococcus koreensis, Granulicatella elegans, Prevotella melaninogenica, Veillonella atypica, Streptococcus gordonii, Veillonella dispar, Veillonella nakazawae, Streptococcus lactarius, Streptococcus downii, Gemella sanguinis, Rothia mucilaginosa, Streptococcus pseudopneumoniae, Prevotella histicola, Abiotrophia defectiva, Gemella haemolysans, Peptostreptococcus stomatis, [Eubacterium] sulci, Veillonella parvula, Porphyromonas pasteri, Prevotella pallens, Gemella taiwanensis, Streptococcus gwangjuense, Prevotella jejuni, Fusobacterium pseudoperiodonticum, Neisseria subflava, Mogibacterium neglectum, Solobacterium moorei, Streptococcus thermophilus, Lachnoanaerobaculum orale, Megasphaera micronuciformis, Fusobacterium periodonticum, S. mutans, Streptococcus shenyangsis, Haemophilus sputorum, Neisseria macacae, Oribacterium parvum, Schaalia odontolytica, Neisseria mucosa, Oribacterium asaccharolyticum, Streptococcus intermedius, Veillonella rogosae, Gemella morbilorum, Oribacterium sinus, Fusobacterium nucleatum, Lachnoanaerobaculum gingivalis, Prevotella vespertina, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus symci, Veillonella massiliensis, Agregatibacter aphrophilus,*

Corynebacterium argentoratense, Lancefieldella parvula, Streptococcus chosunense, Agregatibacter kilianii, Campyobacter concisus, Selenomonas felix, Streptococcus, anginosus, Streptococcus periodonticum, veilllonella infantium, Leptotrichia wadei, Morococcus cerebrosus, Neisseria elongata, Neisseria sicca, Parvimonas micra, Prevotella salivae, Acinetobacter junii, Campylobacter massiliensis, Actinomyces naeslundii, Allorevotella rava, Filifactor alocis, Gemella parahaemolysans, Neisseria cinerea, Parvimonas pava, Porphyromonas endodontalis, Pseudoleptotrichia goodfellowii, Streptococcus constellatus, Vagococcus coleopterorum, y Mogibacterium; todos en ese orden con menos del 1%.

Tabla 14. Abundancia relativa a nivel especie en muestras de saliva de niños con presencia de caries

Especies	Barcode02	Barcode04	Barcode06	Barcode13	Barcode15	Barcode17	Barcode18	Barcode19	Barcode20	Barcode23	Barcode03'	Barcode07'	Barcode08'	Barcode10'	Barcode11'	Total (N)	Abundancia Relativa (%)
Streptococcus salivarius	12	159	353	344	69	160	160	305	509	40	53	71	59	53	38	2385	16.33
Unknown	294	114	316	160	107	128	168	250	203	162	53	53	87	67	57	2219	15.19
Streptococcus parasanguinis	7	76	28	42	18	55	78	96	56	33	8	7	8	2	3	517	3.54
Streptococcus oralis	13	15	57	34	22	17	30	36	17	37	15	5	39	10	4	351	2.40
Streptococcus mitis	14	20	20	9	21	8	14	27	5	16	2	1	8	4	1	170	1.16
Streptococcus infantis	3	15	44	7	12	1	12	14	10	10	12	2	3	18	2	165	1.13
Streptococcus rubneri	0	5	45	7	5	9	17	13	5	10	5	0	7	9	0	137	0.94
Granulicatella adiacens	4	7	22	5	17	14	7	16	15	12	2	2	1	1	4	129	0.88
Streptococcus sanguinis	1	18	21	11	7	7	7	12	2	6	1	4	8	3	0	108	0.74
Streptococcus vestibularis	0	6	10	14	3	5	6	18	12	4	5	7	2	2	1	95	0.65
Streptococcus timonensis	6	6	17	0	4	3	9	25	1	10	4	2	1	3	1	92	0.63
Streptococcus toyakuensis	12	5	9	3	14	13	4	8	3	14	0	0	3	0	0	88	0.60

Streptococcus australis	0	3	33	8	2	6	6	7	4	4	0	1	3	3	0	80	0.55
Streptococcus vulneris	2	12	15	2	14	3	3	10	0	6	3	0	1	3	0	74	0.51
Streptococcus cristatus	1	13	7	4	7	7	22	8	1	0	0	2	0	2	0	74	0.51
Neisseria perflava	68	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	70	0.48
Streptococcus ilei	1	4	31	2	5	5	4	5	0	3	0	1	1	3	0	65	0.45
Streptococcus koreensis	0	0	31	5	4	2	2	6	1	4	2	0	6	0	0	63	0.43
Veillonella atypica	48	0	0	1	0	1	0	0	6	0	0	0	1	0	0	57	0.39
Prevotella melaninogenica	27	0	2	5	0	6	3	0	1	7	0	0	0	0	2	53	0.36
Streptococcus gordonii	0	5	2	1	4	0	19	10	0	10	0	0	0	0	0	51	0.35
Veillonella dispar	35	1	2	0	2	2	1	0	1	3	0	1	1	0	1	50	0.34
Veillonella nakazawae	40	0	2	0	1	0	0	1	3	2	0	0	1	0	0	50	0.34
Haemophilus parainfluenzae	41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	45	0.31
Streptococcus lactarius	0	8	4	3	0	2	5	6	3	4	0	0	0	2	0	37	0.25
Gemella sanguinis	2	1	2	1	4	3	1	1	1	6	1	0	0	1	0	24	0.16
Granulicatella elegans	10	1	0	0	2	0	3	4	0	2	0	0	0	0	0	22	0.15
Streptococcus downii	2	0	3	1	2	3	5	2	0	2	0	0	0	0	0	20	0.14
Gemella haemolysans	3	1	0	0	3	1	1	8	0	1	0	0	0	0	0	18	0.12

Prevotella histicola	4	3	1	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	1	17	0.12
Rothia mucilaginosa	0	1	0	0	3	2	3	2	0	3	0	1	1	0	0	16	0.11
Peptostreptococcus stomatis	4	0	3	1	3	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	15	0.10
Prevotella pallens	10	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	13	0.09
Gemella taiwanensis	2	0	1	0	4	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	12	0.08
Prevotella jejuni	9	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0.08
Streptococcus pseudopneumoniae	3	1	1	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	11	0.08
[Eubacterium] sulci	6	0	0	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	11	0.08
Neisseria subflava	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.08
Solobacterium moorei	1	0	3	0	0	1	0	2	1	2	0	0	0	0	0	10	0.07
Megasphaera micronuciformis	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.07
Streptococcus mutans	0	0	1	1	1	1	4	0	1	1	0	0	0	0	0	10	0.07
Abiotrophia defectiva	3	0	1	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	9	0.06
Mogibacterium neglectum	0	1	0	2	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	9	0.06
Streptococcus gwangjuense	3	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Streptococcus thermophilus	0	0	2	1	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	8	0.05

Lachnoanaerobaculum orale	3	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	8	0.05
Neisseria macacae	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Veillonella parvula	1	0	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	7	0.05
Porphyromonas pasteri	5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7	0.05
Veillonella rogosae	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0.03
Gemella morbillorum	0	0	0	0	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Corynebacterium argentoratense	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0.03
Lancefieldella parvula	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Streptococcus intermedius	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	4	0.03
Oribacterium sinus	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	4	0.03
Fusobacterium nucleatum	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Lachnoanaerobaculum gingivalis	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Streptococcus pneumoniae	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	4	0.03
Veillonella massiliensis	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0.03
Streptococcus anginosus	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Veillonella infantium	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03

Fusobacterium pseudoperiodonticum	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Fusobacterium periodonticum	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Streptococcus shenyangsis	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Oribacterium parvum	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Schaalia odontolytica	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0.02
Oribacterium asaccharolyticum	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Prevotella vespertina	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Neisseria elongata	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Neisseria mucosa	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Streptococcus symci	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Streptococcus chosunense	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0.01
Selenomonas felix	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Leptotrichia wadei	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Morococcus cerebrosus	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Parvimonas micra	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Actinomyces naeslundii	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01

Alloprevotella rava	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Neisseria cinerea	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Porphyromonas endodontalis	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Haemophilus sputorum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Aggregatibacter aphrophilus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Campylobacter concisus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Neisseria sicca	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Prevotella salivae	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Acinetobacter junii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.01
Campylobacter massiliensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.01
Filifactor alocis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Gemella parahaemolysans	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Haemophilus parahaemolyticus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Parvimonas parva	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Pseudoleptotrichia goodfellowii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.01
Streptococcus constellatus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01

Vagococcus coleopterorum	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Mogibacterium vescum	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
																7634	

La tabla 14 muestra la abundancia relativa a nivel especies en las 15 muestras de saliva de niños identificados con presencia de caries. Según el conteo general de los barcodes, la cantidad total de especies encontradas en estas muestras fue de 7634. Las especies que predominan son *Streptococcus salivarius* (16.33%), especies "Unknown" (15.19%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Streptococcus parasanguinis* (3.54%), *Streptococcus oralis* (2.40%), *Streptococcus mitis* (1.16%) y *Streptococcus infantis* (1.13%). Luego están, *Streptococcus rubneri, Granulicatella adiacens, Streptococcus sanguinis, Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus timonensis*, *Streptococcus toyakuensis, Streptococcus australis, Streptococcus vulneris, Streptococcus cristaus, Neisseria perflava, Streptococcus ilei, Streptococcus koreensis, Veillonella atypica, Prevotella melaninogenica, Streptococcus gordonii, Veillonella dispar, Veillonella nakazawae, Haemophilus parainfluenzae, Streptococcus lactarius, Gemella sanguinis, Granulicatella elegans, Streptococcus downii, Gemella haemolysans, Prevotella histicola, Rothia mucilaginosa, Peptostreptococcus stomatis, Prevotella pallens, Gemella taiwanensis, Prevotella pallens, Gemella taiwanensis, Prevotella jejuni, Streptococcus pseudoneumoniae, [Eubacterium] sulci, Neisseria subflava, Solobacterium moorei, Megasphaera micronuciformis, Streptococcus muttans, Abiotrophia defectiva, Mogibacterium neglectum, Streptococcus thermophilus, Lachnoanaerobaculum orale, neisseria macacae, Veillonella parvula, Porphyromonas pasteri, Veillonela rogosae, Gemella*

morbillorum, Corynebacterium argentoratense, Lancefieldelia parvula, Streptococcus intermedius, Oribacterium sinus, Fusobacterium nucleatum, Lachnoanaerobaculum gingivalis, Streptococcus pneumoniae, Veillonella massiliensis, Streptococcus anginosus, Veillonella infantium, Fusobacterium pseudoperiodonticum, Fusobacterium periodonticum, Streptococcus shenyangsis, Oribacterium parvum, Schaalia odontolytica, Oribacterium asaccharolyticum, Prevotella vespertina, Neisseria elongata, neisseria mucosa, Streptococcus symci, Streptococcus chosunense, Selenomonas felix, Leptotrichia wadei, Morococcus cerebrosus, Parvimonas micra, Actinomyces naeslundii, Alloprevotella rava, Neisseria cinerea, Porphyromonas endodontalis, Haemophilus sputorum, Agregatibacter aphrophilus, Campylobacter concisus, Neisseria sicca, Prevotella salivae, Acinetobacter junii, Campylobacter massiliensis, Filifactor alocis, Gemella parahaemolysans, Haemophilus parahaemolyticus, Parvimonas parva, Pseudoleptotrichia goodfellowii, Streptococcus constellatus, Vagococcus coleopterorum, Mogibacterium vescum, Aggregatibacter kilianii y *Streptococcus periodonticum;* todos en ese orden con menos del 1%.

Tabla 15. Abundancia relativa a nivel especie en muestras de saliva de niños sin presencia de caries

Especies	Barcode01	Barcode03	Barcode05	Barcode07	Barcode14	Barcode16	Barcode21	Barcode22	Barcode24	Barcode01'	Barcode02'	Barcode04'	Barcode05'	Barcode06'	Barcode09'	Total (N)	Abundancia Relativa (%)
Unknown	230	149	350	294	186	55	66	250	208	40	45	75	64	49	57	2118	14.50
Streptococcus salivarius	1	1	300	209	86	40	23	21	618	103	43	57	98	75	100	1775	12.15
Streptococcus oralis	10	9	67	86	57	9	6	81	9	0	11	3	5	10	3	366	2.51
Streptococcus parasanguinis	2	4	88	78	32	12	5	31	23	10	6	3	15	19	0	328	2.25
Streptococcus mitis	12	12	23	60	92	9	1	63	3	2	6	4	7	6	3	303	2.07
Streptococcus infantis	7	3	49	24	63	8	12	106	2	0	12	0	3	3	2	294	2.01
Haemophilus parainfluenzae	85	179	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	275	1.88
Streptococcus rubneri	2	3	32	18	46	4	10	56	6	3	9	1	4	4	0	198	1.36
Granulicatella adiacens	1	2	51	17	5	4	3	69	2	0	5	1	3	4	2	169	1.16
Streptococcus timonensis	6	0	6	28	16	3	0	49	0	0	3	1	0	2	1	115	0.79
Streptococcus australis	0	2	13	10	16	1	3	32	5	0	0	1	1	1	6	91	0.62
Streptococcus toyakuensis	1	2	9	23	11	3	1	15	1	3	0	0	1	2	0	72	0.49

Streptococcus ilei	0	1	27	9	12	4	3	11	0	1	0	1	0	1	1	71	0.49
Streptococcus vulneris	3	2	11	4	14	1	0	17	2	3	1	0	3	1	3	65	0.45
Neisseria perflava	41	17	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	64	0.44
Streptococcus sanguinis	4	3	13	15	7	3	1	11	2	1	0	0	0	1	0	61	0.42
Granulicatella elegans	2	1	1	3	1	2	0	47	0	0	0	0	0	0	0	57	0.39
Streptococcus koreensis	1	0	13	7	10	1	4	12	4	0	1	0	1	1	0	55	0.38
Streptococcus cristatus	1	0	6	13	5	2	2	10	0	4	0	0	1	0	0	44	0.30
Streptococcus vestibularis	0	0	5	6	2	2	2	0	10	1	5	1	6	1	2	43	0.29
Rothia mucilaginosa	0	1	1	3	2	1	2	14	0	3	0	1	0	3	0	31	0.21
Streptococcus downii	1	1	4	7	4	0	0	7	2	0	1	1	0	1	0	29	0.20
Gemella sanguinis	0	1	11	2	2	2	2	0	0	0	0	0	1	2	0	23	0.16
Prevotella melaninogenica	3	3	1	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	0.12
Streptococcus lactarius	0	0	8	0	2	0	1	0	1	0	2	0	0	4	0	18	0.12
Streptococcus pseudopneumoniae	0	0	1	11	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	18	0.12
Abiotrophia defectiva	0	0	1	10	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	16	0.11
Veillonella atypica	0	5	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	13	0.09
Streptococcus gordonii	0	0	5	0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	1	11	0.08

Veillonella parvula	1	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.08
Fusobacterium pseudoperiodonticum	2	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.08
Veillonella dispar	0	5	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10	0.07
Prevotella histicola	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	1	3	1	1	0	10	0.07
Porphyromonas pasteri	1	0	1	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	10	0.07
Veillonella nakazawae	0	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
[Eubacterium] sulci	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	8	0.05
Streptococcus gwangjuense	0	0	2	0	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Haemophilus sputorum	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.05
Peptostreptococcus stomatis	1	2	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.05
Fusobacterium periodonticum	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.05
Streptococcus shenyangsis	0	0	0	4	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	7	0.05
Gemella haemolysans	0	0	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Oribacterium parvum	1	0	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Schaalia odontolytica	0	0	0	0	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Neisseria mucosa	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.04
Streptococcus thermophilus	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	2	5	0.03

Oribacterium asaccharolyticum	1	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.03
Prevotella pallens	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0.03
Gemella taiwanensis	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Mogibacterium neglectum	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	4	0.03
Lachnoanaerobaculum orale	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	4	0.03
Streptococcus intermedius	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	4	0.03
Streptococcus symci	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Aggregatibacter aphrophilus	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Aggregatibacter kilianii	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Streptococcus periodonticum	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.03
Prevotella jejuni	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Neisseria subflava	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Solobacterium moorei	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0.02
Veillonella rogosae	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Oribacterium sinus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	3	0.02
Prevotella vespertina	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Streptococcus chosunense	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02

Campylobacter concisus	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.02
Gemella morbillorum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0.01
Fusobacterium nucleatum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0.01
Lachnoanaerobaculum gingivalis	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Streptococcus pneumoniae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0.01
Veillonella massiliensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0.01
Selenomonas felix	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Neisseria sicca	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Prevotella salivae	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.01
Acinetobacter junii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0.01
Campylobacter massiliensis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0.01
Megasphaera micronuciformis	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Neisseria macacae	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Leptotrichia wadei	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Morococcus cerebrosus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Parvimonas micra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.01
Filifactor alocis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01

Gemella parahaemolysans	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Haemophilus parahaemolyticus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Parvimonas parva	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Pseudoleptotrichia goodfellowii	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Streptococcus constellatus	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Vagococcus coleopterorum	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
																6972	

La tabla 15 muestra la abundancia relativa a nivel especies en las 15 muestras de saliva de niños identificados sin presencia de caries. Según el conteo general de los barcodes, la cantidad total de especies encontradas en estas muestras fue de 6972. Las especies que predominan son especies “Unknown” (14.50%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos, *Streptococcus salivarius* (12.15%), *Streptococcus oralis* (2.51%), *Streptococcus parasanguinis* (2.25%), *Streptococcus mitis* (2.07%), *Streptococcus infantis* (2.01%), *Haemophilus parainfluenzae* (1.88%), *Streptococcus rubneri* (1.36%) y *Granulicatella adiacens* (1.16%). Luego están, *Streptococcus timonensis, Streptococcus australis, Streptococcus toyakuensis, Streptococcus ilei*, *Streptococcus vulneris, Neisseria perflava, Streptococcus sanguinis, Granulicatella elegans, Streptococcus koreensis, Streptococcus cristatus, Streptococcus vestibularis, Rothia mucilaginosa, Streptococcus downii, Gemella sanguinis, Prevotella melaninogenica, Streptococcus lactarius, Streptococcus pseudopneumoniae, Abiotrophia*

defectiva, Veillonella atypica, Streptococcus gordonii, Veillonella parvula, Fusobacterium pseudoperiodonticum, Veillonella dispar, Prevotella histicola, Porphyromonas pasteri, Veillonella nakazawae, [Eubacterium] sulci, Streptococcus gwangjuense, Haemophilus sputorum, Peptostreptococcus stomatis, Fusobacterium periodonticum, Streptococcus shenyagsis, Gemella haemolysans, Oribacterium asaccharolyticum, Prevotella pallens, Gemella taiwanensis, Moggibacterium neglectum, Lachnoanaerobaculum orale, Streptococcus intermedius, Streptococcus symci, Agregatibacter kilianii, Streptococcus periodonticum, Prevotella jejuni, Neisseria subflava, Solobacterium moorei, Veillonella rogosae, Oribacterium sinus, Prevotella vespertina, Streptococcus chosunense, Gemellla morbilorum, Fusobacterium nucleatum, Lachnoanaeribaculum gingivalis, Streptococcus pneumoniae, Veillonella massiliensis, Selenomonas felix, Neisseria sicca, Prevotella salivae, Acinetobacter junii, Campylobacter massiliensis, Megasphaera micromuciformis, Neisseria macacae, Leptotrichia wadei, Morococcus cerebrosus, Parvimonas micra, Filifactor alocis, Gemella parahaemolysans, Haemophilus parahaemolyticus, Parvimonas parva, Pseudoleptotrichia goodfellowii, Streptococcus constellatus y *Vagococcus coleopterorum*; todos en ese orden con menos de 1%.

Tabla 16. Diferencias a nivel especie en muestras de saliva de niños con caries y sin caries

Especie	Con caries		Sin caries		Valor de *p*
	N	Abundancia relativa (%)	N	Abundancia relativa (%)	
Streptococcus salivarius	2385	16.33	1775	12.15	0.000
Unknown	2219	15.19	2118	14.50	0.086
Streptococcus parasanguinis	517	3.54	328	2.25	0.000
Streptococcus oralis	351	2.40	366	2.51	0.075
Streptococcus mitis	170	1.16	303	2.07	0.000
Streptococcus infantis	165	1.13	294	2.01	0.000
Haemophilus parainfluenzae	45	0.31	275	1.88	0.000
Streptococcus rubneri	137	0.94	198	1.36	0.000
Granulicatella adiacens	129	0.88	169	1.16	0.002
Streptococcus sanguinis	108	0.74	61	0.42	0.003
Streptococcus vestibularis	95	0.65	43	0.29	0.000
Streptococcus timonensis	92	0.63	115	0.79	0.028
Streptococcus toyakuensis	88	0.60	72	0.49	0.538
Streptococcus australis	80	0.55	91	0.62	0.172
Streptococcus vulneris	74	0.51	65	0.45	0.885
Streptococcus cristatus	74	0.51	44	0.30	0.029
Neisseria perflava	70	0.48	64	0.44	1.000
Streptococcus ilei	65	0.45	71	0.49	0.336
Streptococcus koreensis	63	0.43	55	0.38	0.879
Veillonella atypica	57	0.39	13	0.09	0.000
Prevotella melaninogenica	53	0.36	18	0.12	0.000
Streptococcus gordonii	51	0.35	11	0.08	0.000
Veillonella dispar	50	0.34	10	0.07	0.000
Veillonella nakazawae	50	0.34	8	0.05	0.000

Streptococcus lactarius	37	0.25	18	0.12	0.036
Gemella sanguinis	24	0.16	23	0.16	0.985
Granulicatella elegans	22	0.15	57	0.39	0.000
Streptococcus downii	20	0.14	29	0.20	0.143
Gemella haemolysans	18	0.12	6	0.04	0.043
Prevotella histicola	17	0.12	10	0.07	0.357
Rothia mucilaginosa	16	0.11	31	0.21	0.019
Peptostreptococcus stomatis	15	0.10	7	0.05	0.200
Prevotella pallens	13	0.09	4	0.03	0.079
Gemella taiwanensis	12	0.08	4	0.03	0.116
Prevotella jejuni	12	0.08	3	0.02	0.058
Streptococcus pseudopneumoniae	11	0.08	18	0.12	0.174
[Eubacterium] sulci	11	0.08	8	0.05	0.794
Neisseria subflava	11	0.08	3	0.02	0.088
Solobacterium moorei	10	0.07	3	0.02	0.133
Megasphaera micronuciformis	10	0.07	1	0.01	0.024
Streptococcus mutans	10	0.07	0	0.00	0.007
Abiotrophia defectiva	9	0.06	16	0.11	0.153
Mogibacterium neglectum	9	0.06	4	0.03	0.343
Streptococcus gwangjuense	8	0.05	8	0.05	1.000
Streptococcus thermophilus	8	0.05	5	0.03	0.695
Lachnoanaerobaculum orale	8	0.05	4	0.03	0.478
Neisseria macacae	8	0.05	1	0.01	0.062
Veillonella parvula	7	0.05	11	0.08	0.368
Porphyromonas pasteri	7	0.05	10	0.07	0.501
Veillonella rogosae	5	0.03	3	0.02	0.821
Gemella morbillorum	5	0.03	2	0.01	0.524
Corynebacterium argentoratense	5	0.03	0	0.00	0.091
Lancefieldella parvula	5	0.03	0	0.00	0.091

Streptococcus intermedius	4	0.03	4	0.03	1.000
Oribacterium sinus	4	0.03	3	0.02	1.000
Fusobacterium nucleatum	4	0.03	2	0.01	0.766
Lachnoanaerobaculum gingivalis	4	0.03	2	0.01	0.766
Streptococcus pneumoniae	4	0.03	2	0.01	0.766
Veillonella massiliensis	4	0.03	2	0.01	0.766
Streptococcus anginosus	4	0.03	0	0.00	0.158
Veillonella infantium	4	0.03	0	0.00	0.158
Fusobacterium pseudoperiodonticum	3	0.02	11	0.08	0.041
Fusobacterium periodonticum	3	0.02	7	0.05	0.274
Streptococcus shenyangsis	3	0.02	7	0.05	0.274
Oribacterium parvum	3	0.02	6	0.04	0.422
Schaalia odontolytica	3	0.02	6	0.04	0.422
Oribacterium asaccharolyticum	3	0.02	5	0.03	0.630
Prevotella vespertina	3	0.02	3	0.02	1.000
Neisseria elongata	3	0.02	0	0.00	0.281
Neisseria mucosa	2	0.01	6	0.04	0.234
Streptococcus symci	2	0.01	4	0.03	0.603
Streptococcus chosunense	2	0.01	3	0.02	0.919
Selenomonas felix	2	0.01	2	0.01	1.000
Leptotrichia wadei	2	0.01	1	0.01	1.000
Morococcus cerebrosus	2	0.01	1	0.01	1.000
Parvimonas micra	2	0.01	1	0.01	1.000
Actinomyces naeslundii	2	0.01	0	0.00	0.520
Alloprevotella rava	2	0.01	0	0.00	0.520
Neisseria cinerea	2	0.01	0	0.00	0.520
Porphyromonas endodontalis	2	0.01	0	0.00	0.520
Haemophilus sputorum	1	0.01	8	0.05	0.032

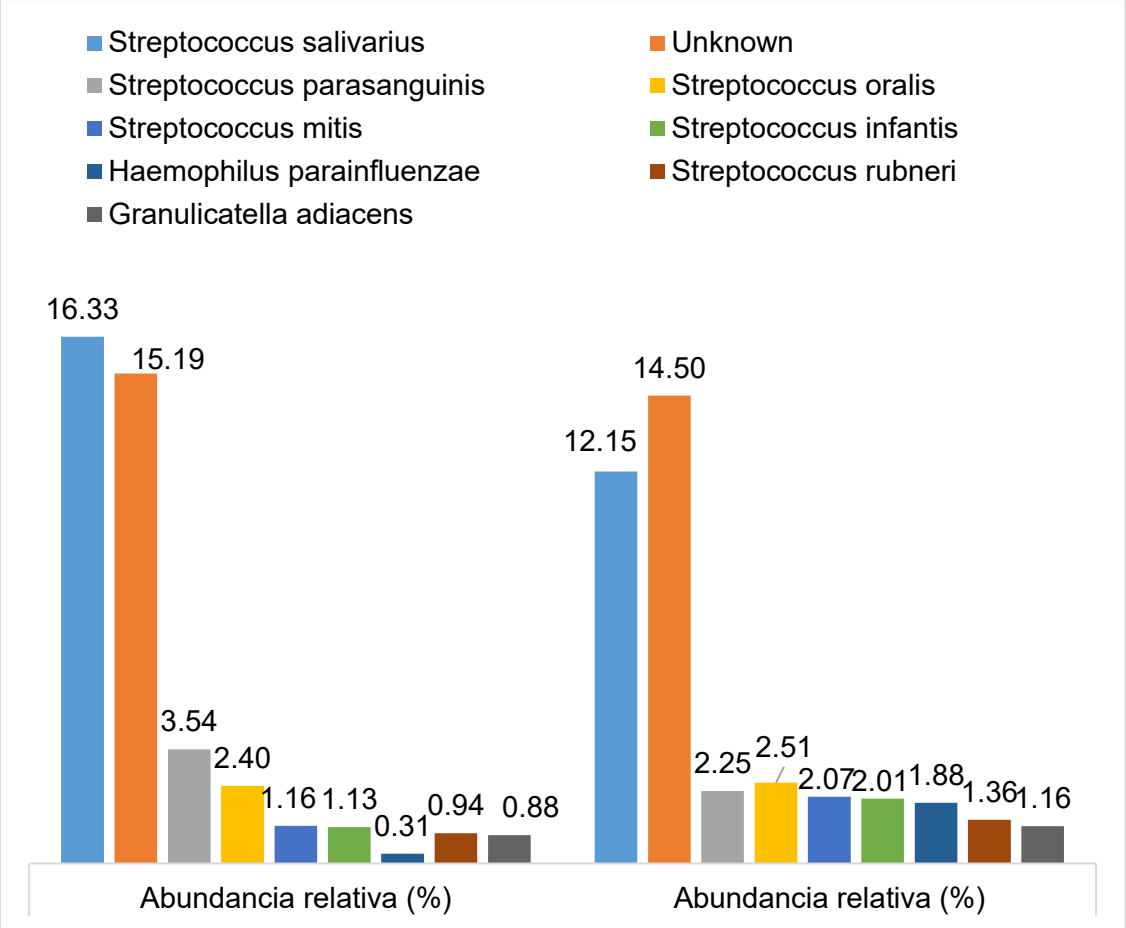
Aggregatibacter aphrophilus	1	0.01	4	0.03	0.319
Campylobacter concisus	1	0.01	3	0.02	0.554
Neisseria sicca	1	0.01	2	0.01	0.937
Prevotella salivae	1	0.01	2	0.01	0.937
Acinetobacter junii	1	0.01	2	0.01	0.937
Campylobacter massiliensis	1	0.01	2	0.01	0.937
Filifactor alocis	1	0.01	1	0.01	1.000
Gemella parahaemolysans	1	0.01	1	0.01	1.000
Haemophilus parahaemolyticus	1	0.01	1	0.01	1.000
Parvimonas parva	1	0.01	1	0.01	1.000
Pseudoleptotrichia goodfellowii	1	0.01	1	0.01	1.000
Streptococcus constellatus	1	0.01	1	0.01	1.000
Vagococcus coleopterorum	1	0.01	1	0.01	1.000
Mogibacterium vescum	1	0.01	0	0.00	1.000
Aggregatibacter kilianii	0	0.00	4	0.03	0.111
Streptococcus periodonticum	0	0.00	4	0.03	0.111

En la tabla 16 se muestran las diferencias encontradas a nivel especies en muestras de saliva de niños con caries y sin caries. Del total especies (14606), los especies encontrados en muestras de saliva de niños con caries (52.27%) fueron más abundantes que las especies encontrados en muestras de saliva de niños sin caries (47.73%). Las especies más abundantes en las muestras de saliva de niños con caries que en las muestras de saliva de niños sin caries son: *Streptococcus salivarius,* especies unknown que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos*., Streptococcus parasanguinis, Streptococcus sanguinis, Streptococcus vestibularis, Streptococcus toyakunensis, Streptococcus cristatus, Streptococcus vulneris, Neisseria perflava, Streptococcus koreensis, Veillonella atypica, Prevotella melaninogenica, Streptococcus gordonii, Veillonella dispar,*

Veillonella nakazawae, Streptococcus lactarius, Gemella sanguinis, Gemella haemolysans, Prevotella histicola, Peptostreptococcus stomatis, Prevotella pallens, Gemella taiwanensis, Prevotella jejuni, [Eubacterium] sulci, Neisseria subflava, Solobacterium moorei, Megasphaera micronuciformis, S. mutans, Mogibacterium neglectum, Streptococcus termophilus, Lachnoanaeribaculum orale, Neisseria macacae, Veillonella rogosae, Gemella morbillorum, Corynebacterium argentoratense, Lancefieldella parvula, Oribacterium sinus, Fusobacterium nucleatum, Lachnoanaerobaculum gingivalis, Strerptococcus pneumoniae, Veillonella massiliensis, Streptococcus anginosus, Veillonella infantium, Neisseria elongata, Leptotrichia wadei, Morococcus cerebrosus, Parvimonas micra, Actinomyces naeslundii, Alloprevotella rava, Neisseria cinerea, Porphyromonas endodontalis y *Mogibacter vescum.* Las especies más abundantes en las muestras de saliva de niños sin caries que en las muestras de saliva de niños con caries son: *Streptococcus oralis, Streptococcus mitis, Streptococcus infantis, Haemophilus parainfluenzae, Streptococcus rubneri, Granulicatella adiacens, Streptococcus timonensis, Streptococcus australis, Streptococcus ilei, Granulicatella elegans, Streptococcus downii, Rothia mucilaginosa, Streptococcus pseudoneumoniae, Abiotrophia defectiva, Veillonella parvula, Porphyromonas pasteri, Fusobacterium pseudoperiodonticum, Fusobacterium periodonticum, Streptococcus shenyangsis, Oribacterium parvum, Schaalia odontolytica, Oribacterium asaccharolyticum, Neisseria mucosa, Streptococcus chosunense, Haemophilus sputorum, Aggregatibacter aphrophilus, Campylobacter concisus, Neisseria sicca, Prevotella salivae, Acinetobacter junii, Campylobacter massiliensis, Aggregatibacter kilianii* y *Streptococcus periodonticum.* Los se encuentran en mismo porcentaje de abundancia en ambos tipos de muestras son: *Streptococcus intermedius, Prevotella vespertina, Selenomonas felix, Filifactor alocis, Gemella parahaemolysans, Haemophilus parahaemolyticus, Parvimonas parva, Pseudoleptotrichia goodfellowii, Streptococcus constellatus* y *Vagococcus coleopterorum*. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en

los *Haemophilus parainfluenzae, Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis, Streptococcus infantis, Streptococcus parasanguinis, Veillonella nakazawae, Veillonella atypica, Veillonella dispar, Streptococcus gordonii, Granulicatella elegans, Streptococcus rubneri, Streptococcus vestibularis, Prevotella melaninogenica, Granulicatella adiacens, Streptococcus sanguinis, S. mutans, Rothia mucilaginosa, Megasphaera micronuciformis, Streptococcus timonensis, Streptococcus cristatus, Haemophilus sputorum, Streptococcus lactarius, Fusobacterium pseudoperiodonticum* y *Gemella haemolysans.*

Gráfico 3. Diferencias a nivel especie en muestras de saliva de niños con caries y sin caries



En el gráfico 3 se muestra las diferencias encontradas a nivel especies en muestras de saliva de niños con caries y sin caries. En las muestras de saliva de niños con caries son más abundantes los *Streptococcus salivarius* (16.33%), especies unknown (15.19%) que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos y *Streptococcus parasanguinis* (3.54%), que en las muestras de saliva de niños sin caries. En las muestras de saliva de niños sin caries son más abundantes los *Streptococcus oralis* (2.51%), *Streptococcus mitis* (2.07%), *Streptococcus infantis* (2.01%), *Haemophilus parainfluenzae* (1.88%), *Streptococcus rubneri* (1.36%) y *Granilicatella adiacens* (1.16%), que en las muestras de saliva de niños con caries.

VI. DISCUSIÓN

Esta investigación brinda información relevante sobre la caracterización del microbioma oral en niños que presentaron y también que no presentaron caries dental, realizado gracias a la Tecnología Oxford Nanopore a través de su secuenciador y celda de flujo, demostrando como resultado la abundancia de ciertos microorganismos los cuales podrían estar relacionado con la aparición de caries, periodontitis, gingivitis u otras enfermedades sistémicas.

La secuenciación es una técnica que proporciona información sobre genomas más específicos que por ejemplo con el clásico método de cultivo no se lograría encontrar más variedad de microorganismos[55], y también permite trabajar las muestras en grupo siendo así más rápido la obtención de resultados. Existen estudios en los cuales se han encontrado resultados similares, así como también hay investigaciones con la que se puede discordar.

Los resultados generales obtenidos determinan una mayor abundancia de *phylum Firmicutes* (60.94%); en este caso, Crielaard et al., (2011) tuvieron como resultado predominante a los *Firmicutes* en todos sus grupos de estudio[11], Liff et al., (2015) determinaron que los *phylum* más abundantes son los *Firmicutes* y *Bacteroidotas*[24] y Eriksson et al., (2017) obtuvieron *Firmicutes* como *phylum* más abundante en saliva (48%)[26].

Así también se determina una mayor abundancia de géneros *Streptococcus* (58.99%); en este caso, Liff et al., (2015) determinaron que los géneros que predominaron fueron los *Streptococcus, Gemella y Veillonella*[24], Eriksson et al., (2017) determinaron que el género que predominó fue el *Streptococcus* (32%)[26].

Además, se determinó abundancia en especies unknown que en las lecturas no fueron identificados porque no se encuentran en la base de datos (29.26%) y *Streptococcus salivarius* (28.48%); este último, tanto en las muestras de saliva de niños con caries

como en el de sin caries, predominando en el primer grupo con una considerable diferencia en número. El *Streptococcus salivarius* es de las especies iniciales que ocupan la mucosa poco después de nacer y es uno de los microorganismos más sobresalientes en la cavidad bucal durante toda la vida[56].

En la investigación de Takeshi et al., (2016) se encontró especies bacterianas como *Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius y Granulicatella adiacens*[12]*;* así también Mat et al., (2015) encontró *Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius, Streptococcus australis, Haemophilus parainfluenzae, Granulicatella adiacens y Rothia* mucilaginosa[25]; también, en el análisis de García et al., (2021) se encontró que los *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius* fueron las especies con una abundancia considerable[28]; y contrastando con los resultados obtenidos en esta investigación, estás especies están entre los más abundantes en el total de las muestras.

Esta investigación ha buscado conocer la diversidad microbiana de la cavidad oral en una población peruana de niños, en este caso empleando un nuevo método como lo es la secuenciación genómica. Una tecnología nueva que sigue avanzando en actualizaciones para definir mejor, de manera más práctica y más rápido, la diversidad taxonómica. A pesar de ser solo una población de 30 niños, se encontró 5 clases de *phylum* que en todo el conteo hizo 14641, 36 clases de género que hizo un conteo total de 14634 y 97 clases de especies que hizo un conteo total de 14606. Hay limitaciones como en todo proceso nuevo, sea los recursos o conocimientos, pero marca un precedente en cuanto a conocimiento y datos sobre futuras investigaciones.

Esta investigación, a través de la secuenciación de genes, ha logrado demostrar que se puede determinar la presencia o ausencia de ciertas especies en muestras de saliva de niños con caries; que, además haciendo una comparación, se pueden encontrar o no en muestras de saliva de sin caries. En el caso del *Streptococcus mutans*, mostró que todos los conteos encontrados solo fueron en el grupo de muestras de saliva de niños con caries, pero con una abundancia menor al 1% comparado con otras especies

encontradas. Si bien es cierto el *Streptococcus mutans* es el principal microorganismo estudiado relacionado a la caries dental, existen más especies bacterianas encontradas que merecen estudios enfocados que podrían estar relacionadas con dicha enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

- La secuenciación genómica mediante la Tecnología Oxford Nanopore, a través del uso del dispositivo minION, pudo caracterizar el microbioma obteniendo 5 tipos de *phylum*, 36 tipos de género y 97 tipos de especie. Así también, se halló *phylum*, géneros y especies mencionados como unknown, los cuales no se encuentran identificados en la base de datos del software.

- En la caracterización de comensales orales se contabilizó y sumó el total de lo encontrado en cada barcode, obteniéndose 14641 como total de *phylum*, 14634 como total de géneros y 14606 como total de especies.

- En el total de las muestras de saliva, la caracterización del microbioma conllevó a tener una gran diversidad de *phylum* como *Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota,* entre otros; de géneros como *Streptococcus, Granulicatella, Haemophilus,* entre otros; y de especies como *Streptococcus salivarius, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus oralis,* entre otros.

- Comparando la caracterización a nivel *phylum*, género y especie de las muestras de saliva de los niños con caries y sin caries, se notaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) tales como en los *Firmicutes, Proteobacteria* y *Bacteroidota* a nivel *phylum;* en los *Streptococcus, Haemophilus* y *Granulicatella* entre los más relevantes a nivel género; y en los

Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis, Streptococcus parasanguinis entre los más relevantes a nivel especie.

VIII. RECOMENDACIONES

- No hay estudios suficientes publicados en el país sobre secuenciamiento genético con muestras bucales, por lo que se recomienda introducirse en el mundo de la biología genética y relacionarlo con la Odontología.

- Obtener en lo posible las nuevas tecnologías para futuras investigaciones y así poder descubrir los *phylum,* géneros y/o especies que aún se desconocen; y poder tener una base de datos.

- Investigar de otras especies bacterianas que también son abundantes en la cavidad oral tales como *Streptococcus salivarius, Granulicatella adiacens Streptococcus vestibularis* entre otros, en poblaciones peruanas.

- Caracterizar haciendo uso de otros secuenciadores de la Tecnología Oxford Nanopore como el GridION o PromethION; así también con Tecnología Illumina o PacBio para obtener resultados complementarios y comparativos al minION.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. Periodontol 2000 [Internet]. 2021 [cited 2023 May 3];87(1):107–31. https://doi.org/10.1111/prd.12393

2. Benn A, Heng N, Broadbent J, Thomson W. Studying the human oral microbiome: challenges and the evolution of solutions. Aust Dent J [Internet]. 2018 [cited 2023 Aug 18];63(1):14–24. https://doi.org/10.1111/adj.12565

3. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol. 2014;63(2):127–35. PMID: 25115106

4. Costalonga M, Herzberg M. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunol Lett [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2024 Oct 21];162(2, Part A):22–38. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017

5. Suárez A. Microbioma y secuenciación masiva. Rev Esp Quimioter [Internet]. 2017 [cited 2023 May 4];30(5):305–11.

6. Jain M, Olsen H, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. Genome Biol [Internet]. 2016 Nov 25 [cited 2024 Oct 21];17(1):239. https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0

7. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. Genomics Proteomics Bioinformatics [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Oct 21];14(5):265–79. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004

8. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss J, et al. The NIH Human Microbiome Project. Genome Res [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 May 3];19(12):2317–23. https://doi.org/10.1101/gr.096651.109 PMID: 19819907

9. Deo P, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J Oral Maxillofac Pathol JOMFP [Internet]. 2019 [cited 2023 May 3];23(1):122–8. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18 PMID: 31110428

10. Fernández O, Rodríguez P, Flores M, Mobili D, Aguilera M. El microbioma y el viroma humano: una nueva perspectiva dentro de las patologías bucales y sistémicas. Revisión bibliográfica. Odontol Sanmarquina [Internet]. 2020 Aug 3 [cited 2023 May 3];23(3):271–9. https://doi.org/10.15381/os.v23i3.17606

11. Crielaard W, Zaura E, Schuller A, Huse SM, Montijn R, Keijser B. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. BMC Med Genomics [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2023 Jul 2];4(1):22. https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-22

12. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. Sci Rep [Internet]. 2016 Feb 24 [cited 2023 Jul 2];6(1):22164. https://doi.org/10.1038/srep22164

13. Baker J. Using Nanopore Sequencing to Obtain Complete Bacterial Genomes from Saliva Samples. mSystems [Internet]. 2022 Aug 22 [cited 2023 May 4];7(5):e00491-22. https://doi.org/10.1128/msystems.00491-22

14. Jain M, Fiddes I, Miga K, Olsen H, Paten B, Akeson M. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer. Nat Methods [Internet]. 2015 Apr [cited 2023 May 5];12(4):351–6. https://doi.org/10.1038/nmeth.3290 PMID: 25686389

15. Mitsuhashi S, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi J, Shiraishi Y, Asano K, et al. A portable system for rapid bacterial composition analysis using a nanopore-based sequencer and laptop computer. Sci Rep [Internet]. 2017 Jul 18 [cited 2023 May 5];7(1):5657. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05772-5

16. Rosales T, Calla R, Maita L, Bocanegra R, Luque S, Requena M. Characterization of the oral microbiome with genome sequencing using Oxford Nanopore technology in Peruvian children.

17. Cabrera R. Análisis taxonómico y funcional del microbioma humano mediante aproximaciones clásicas, moleculares y metagenómicas. [Internet]. Universidad de Valencia; 2014 [cited 2023 Jul 1].

18. Minsa advierte que 9 de cada 10 escolares presentan caries dentales [Internet]. Diario El Peruano. 2022 [cited 2023 Jul 2]. https://elperuano.pe/noticia/141696-minsa-advierte-que-9-de-cada-10-escolares-presentan-caries-dentales (accessed 2023 Jul 2)

19. Ramos C, Urure O, Wisa G. Caries dental en niños menores de 12 años [Internet]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022 [cited 2024 Jan 8].

20. REUNIS: Repositorio Único Nacional de Información en Salud - Ministerio de Salud [Internet]. [cited 2024 Jan 8]. https://www.minsa.gob.pe/reunis/data/tablero_salud-bucal.asp (accessed 2024 Jan 8)

21. Gómez A, López Y, Aguirre M, Gómez A, López Y, Aguirre M. Microbioma oral: variabilidad entre regiones y poblaciones. Rev Fac Med México [Internet]. 2022 Oct [cited 2023 Jul 1];65(5):8–19. https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2022.65.5.02

22. Chávez J. Evaluación de la microbiota oral de los pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos del hospital regional Hermilio Valdizán Medrano Huánuco - 2019 [Internet]. Universidad de Huánuco; 2023.

23. Guerrero GT. Microbioma humano y microbioma oral. Una revisión. Rev Científica Odontológica [Internet]. 2016 [cited 2023 Jul 2];4(2):547–54. https://doi.org/10.21142/2523-2754-0402-2016-547-554

24. Lif P, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. Wen Z, editor. PLOS ONE [Internet]. 2015 May 28 [cited 2023 Aug 14];10(5):e0128534. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128534

25. Ma C, Chen F, Zhang Y, Sun X, Tong P, Si Y, et al. Comparison of Oral Microbial Profiles between Children with Severe Early Childhood Caries and Caries-Free Children Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. PLoS ONE [Internet]. 2015 Mar 30 [cited 2023 Aug 10];10(3):e0122075. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122075 PMID: 25821962

26. Eriksson L, Lif P, Johansson I. Saliva and tooth biofilm bacterial microbiota in adolescents in a low caries community. Sci Rep [Internet]. 2017 Jul 19 [cited 2023 Aug 14];7:5861. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06221-z PMID: 28724921

27. Cedeño MC, Murillo D, Torres F. Caracterización de la microbiota oral en adolescentes de 15 años. Rev Científica “Especialidades Odontológicas UG” [Internet]. 2020 Apr 14 [cited 2023 Aug 10];3(1):61–72. https://doi.org/10.53591/eoug.v3i1.300

28. Garcia BA, Acosta NC, Tomar SL, Roesch LFW, Lemos JA, Mugayar LRF, et al. Association of Candida albicans and Cbp+ Streptococcus mutans with early childhood caries recurrence. Sci Rep [Internet]. 2021 May 24 [cited 2025 Jan 8];11(1):10802. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90198-3

29. Chilon M, Muñoz J, Silva H. Microbiological profile of isolated microorganisms from patients in intensive care units of a Hospital in Lambayeque, Peru, 2019-2020. Rev Fac Med Humana [Internet]. 2022 Mar 16 [cited 2023 Aug 10];22(2):335–44. https://doi.org/10.25176/RFMH.v22i2.4275

30. Jitvaropas R, Mayuramart O, Sawaswong V, Kaewsapsak P, Payungporn S. Classification of salivary bacteriome in asymptomatic COVID-19 cases based on long-read nanopore sequencing. Exp Biol Med [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2024 Dec 6];247(21):1937–46. https://doi.org/10.1177/15353702221118091

31. Raksakmanut R, Thanyasrisung P, Sritangsirikul S, Kitsahawong K, Seminario AL, Pitiphat W, et al. Prediction of Future Caries in 1-Year-Old Children via the Salivary Microbiome. J Dent Res [Internet]. 2023 Jun [cited 2025 Jan 8];102(6):626–35. https://doi.org/10.1177/00220345231152802 PMID: 36919874

32. Barboza C, Acuña L. The Oral Microbiota: A Literature Review for Updating Professionals in Dentistry. Part I. Odovtos - Int J Dent Sci [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Aug 16];143–52. https://doi.org/10.15517/ijds.2020.39178

33. Mark J, Dewhirst F, Borisy G. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 16];73(1):335–58. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062503 PMID: 31180804

34. Kilian M. The oral microbiome – friend or foe? Eur J Oral Sci [Internet]. 2018 [cited 2023 Aug 17];126(S1):5–12. https://doi.org/10.1111/eos.12527

35. HOMD :: Taxon Hierarchy [Internet]. Expanden Human Oral Microbiome Database V3.1. [cited 2023 Oct 13]. https://www.homd.org/taxa/tax_hierarchy (accessed 2023 Oct 13)

36. Astorga B, Barraza C, Casals J, Cisterna M, Mena D, Morales F, et al. Avances en el Estudio de la Diversidad Bacteriana Oral Asociada a Caries Dental Mediante el Estudio Genómico. Int J Odontostomatol [Internet]. 2015 Dec [cited 2023 Aug 20];9(3):349–56. https://doi.org/10.4067/S0718-381X2015000300002

37. Flow cells [Internet]. Oxford Nanopore Technologies. 2023 [cited 2023 Aug 20]. https://nanoporetech.com/how-it-works/flow-cells-and-nanopores (accessed 2023 Aug 20)

38. Tosco E. Análisis de datos en Biocomputación: Tecnologia MinION y herramientas bioinformáticas [Internet]. [España]: Universidad de La Laguna; 2019 [cited 2023 Aug 20].

39. How basecalling works [Internet]. Oxford Nanopore Technologies. [cited 2023 Aug 21]. https://nanoporetech.com/how-it-works/basecalling (accessed 2023 Aug 21)

40. Saladrigas V, Claros G, González D. Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular (4.ª entrega). Panace@ [Internet]. 2003 [cited 2023 Aug 21];4(13–14):110.

41. Sarduy L, González M. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. Medicentro [Internet]. 2016;20(3):8.

42. Badii MH, Cerna E, Landeros J. Papel de los Ecosistemas en la Sustentabilidad. CULCyT Cult Científica Tecnológica [Internet]. 2007 [cited 2023 Aug 22];4(21):3.

43. Barroso E. Interacciones de los polifenoles del vino con la microbiota de la cavidad bucal humana [Internet]. [España]: Universidad Autónoma de Madrid; 2011 [cited 2023 Aug 22].

44. Pachés M. Sistema de clasificación de los seres vivos [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 22]. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/118401/Pach%C3%A9s%20-%20Sistema%20de%20clasificaci%C3%B3n%20de%20los%20seres%20vivos.pdf?sequence=1& (accessed 2023 Aug 22)

45. López G, García A. Los apellidos en la ciencia ¿Qué es un taxón? [Internet]. INECOL. 2021 [cited 2023 Aug 22]. https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1296-los-apellidos-en-la-ciencia-que-es-un-taxon (accessed 2023 Aug 22)

46. Sebastián J, Sánchez C. De la flora intestinal al microbioma. Rev Esp Enfermedades Dig [Internet]. 2018 Jan [cited 2023 Aug 22];110(1):51–6. https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017

47. Rinardo V. DNA sequencing using nanopores and de novo assembly. 2018 Jun [cited 2025 May 27];(96):6.

48. Wetterstrand K. Nanopore DNA Sequencing [Internet]. National Human Genome Research Institute. 2023 [cited 2023 Aug 22]. https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nanopore-DNA-Sequencing (accessed 2023 Aug 22)

49. Guzmán S. Los microbios y la ecología. Rev Ciencia [Internet]. 2017 [cited 2023 Aug 22];68(2):10.

50. Brody L. Nucleotide [Internet]. National Human Genome Research Institute. 2023 [cited 2023 Aug 22]. https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Nucleotido (accessed 2023 Aug 22)

51. Cummings P, Ahmed R, Durocher J, Jessen A, Vardi T, Obom K. Pyrosequencing for Microbial Identification and Characterization. J Vis Exp [Internet]. 2013 Aug 22 [cited 2023 Aug 22];(78):10. https://doi.org/10.3791/50405

52. Aguilar L, Falquet L. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. Rev Salud Anim [Internet]. 2015 Aug [cited 2023 Aug 22];37(2):125–32.

53. Secuenciación del ADN [Internet]. Khan Academy. [cited 2023 Aug 22]. https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing (accessed 2023 Aug 22)

54. Llames M. Diversidad y ecología de las comunidades microbiológicas de las lagunas pampeanas [Internet]. Universidad de Buenos Aires; 2011 [cited 2023 Aug 22].

55. Pizarro D. Secuenciación metagenómica y nuevos procedimientos bioinformáticos para entender la evolución de hongos liquenizados [Internet] [http://purl.org/dc/dcmitype/Text]. [España]: Universidad Complutense de Madrid; 2019 [cited 2024 Oct 21].

56. Delorme C, Abraham A, Renault P, Guédon E. Genómica de Streptococcus salivarius, un importante comensal humano. Infect Genet Evol [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2024 Oct 21];33:381–92. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.001

X. ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

Problema General	Objetivo General	Objetivos Específicos	Hipótesis	Variable	Metodología
¿Cuál es la caracterización del microbioma oral usando Tecnología de Oxford Nanopore en 60 niños peruanos de 8 a 10 años?	Determinar la caracterización de comensales orales del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.	Determinar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a los phylum del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries. Determinar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a los géneros del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries. Determinar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a las especies del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries. Comparar la caracterización a nivel bacteriano de acuerdo a los phylum, géneros y especies del microbioma oral obtenidos por Tecnología de Oxford Nanopore, de niños peruanos con caries y sin caries.	Hipótesis general: Existe diferencia entre las bacterias bucales en el microbioma salival de niños peruanos con caries y sin caries usando Tecnología de Oxford Nanopore. Hipótesis especificas: Existen diferencias significativas a nivel bacteriano de acuerdo a los phylum, géneros y especies del microbioma salival usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.	Microbioma bacteriano bucal	Tipo y diseño de investigación: Descriptivo, observacional, transversal. Población: Niños peruanos de 8 a 10 años de edad de la ciudad de Lima, Perú de la Institución Educativa N° 3036 “José Andrés Rázurl”, niños de tercer, cuarto y quinto grado Muestra: Se tuvo en cuenta el método no probabilístico intencionado por conveniencia, por lo tanto, la muestra fue de 30 niños peruanos de 8 a 10 años con y sin caries; y la saliva como unidad de análisis muestral.

Anexo 2. Carta de presentación

Institución Educativa N° 3036 “José Andrés Rázuri”

Firmado digitalmente por WATANABE VELASQUEZ Romel Armando FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.05.2024 14:56:04 -05:00

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DECANATO

Lima, 08 de Mayo del 2024

CARTA DE PRESENTACIÓN N° 000036-2024-D-FO/UNMSM

Magister
YOLANDA GÓMEZ DÁVILA
Directora
Institución Educativa n.° 3036 “José Andrés Rázuri”,
Presente. -

De mi mayor consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarla cordialmente y, mediante el presente me complace en presentar a la Br. **LALY ABIGAIL ROJAS RODRÍGUEZ**, egresada de la Escuela Profesional de Odontología, de la Facultad de Odontología, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; identificada con D.N.I. 71469569 y código n.° 13050020.

Así también, hago de su conocimiento que la Br. **ROJAS RODRÍGUEZ** se encuentra desarrollando su tesis titulada “CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA ORAL USANDO TECNOLOGÍA DE OXFORD NANOPORE EN NIÑOS PERUANOS, 2024”, con el propósito de obtener su título profesional de cirujana dentista.

Al respecto, la tesista en mención, desea ejecutar su trabajo de investigación en la institución que usted tan dignamente dirige; por tal motivo, solicito respetuosamente a su despacho que se brinde las facilidades pertinentes para tal fin.

Sin otro particular, sea propicia la oportunidad para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,

DR. ROMEL ARMANDO WATANABE VELÁSQUEZ
DECANO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

RWV/apc

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026- 2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: **https://spsgd.unmsm.edu.pe/verifica/inicio.do** e ingresando el siguiente código de verificación: **FHYXYRU**

Anexo 3. Consentimiento informado de los padres / tutores

Reciba mi cordial saludo, soy Bachiller en Odontología de la Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, estamos realizando una investigación titulada “CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA ORAL USANDO TECNOLOGÍA DE OXFORD NANOPORE EN NIÑOS PERUANOS, 2024”, el mismo que servirá para optar mi título profesional de Cirujano Dentista en Odontología. Para ello le solicito autorice la participación voluntaria de su hijo(a).

Propósito del estudio: Determinar las características de comensales orales del microbioma oral caracterizados con secuenciación de genomas, usando Tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos con caries y sin caries.

Procedimiento: Si usted autoriza la participación de su hijo(a) en el estudio, se le realizará una evaluación oral a cargo de un odontólogo y toma de muestra salival. Puede decidir no continuar su participación en cualquier momento si así lo desea.

Beneficios: Los beneficios de participar en el estudio serán: un examen oral clínico gratuito y el descarte de presencia de caries.

Riesgos presentes en el estudio y costo de participación: No se le realizarán procedimientos ni usarán fármacos, por lo tanto, no hay riesgo de causar daños en su salud. Además, la investigación no tendrá costo para usted.

Confidencialidad: Su colaboración será anónima. Su nombre no aparecerá en ningún documento ni tiene que colocarlo en el instrumento (fichas). En ningún momento se afectará su integridad física ni moral.

Por lo explicado, comprendo que mi autorización es importante para el desarrollo del estudio de investigación. Sé que mis respuestas a las preguntas serán utilizadas para fines de investigación y no se identificará. He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha respondido

satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Autorizo voluntariamente que mi hijo(a)_____, ingrese a esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarlo de la investigación en cualquier momento sin que exista ningún tipo de represalia por ello. Entiendo que el resultado de la investigación será presentado a la comunidad científica para su mejor comprensión. Yo, _____, dejo mi firma y/o huella digital y N° de DNI en señal de aceptación de participar en la investigación.

Nombre de padre de familia y/o tutor: _____

N° de DNI: _____

Firma y/o huella digital: _____

Nombre de la investigadora: _____

Anexo 4. Asentimiento informado de los alumnos menores de edad

Hola, soy Laly Abigail Rojas Rodríguez, estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Me encuentro en el aula de tu colegio porque estoy realizando una investigación y por ello desearía que me ayudes voluntariamente para poder ver tus dientes y también quisiera que me ayudes llenando un tubo pequeño con un poco de tu saliva.

Si estás de acuerdo puedes marcar con una “X” la opción SI ESTOY DE ACUERDO y si no estás de acuerdo puedes marcar con una “X” la opción NO ESTOY DE ACUERDO”.

SI ESTOY DE ACUERDO	NO ESTOY DE ACUERDO

Edad: _____

Grado: _____

Fecha: _____/_____/_____

Firma y/o huella del alumno: _____

Nombre y firma de la persona que explica el asentimiento:

_____

Anexo 5. Ficha de recolección de datos

Edad: _____

Sexo:

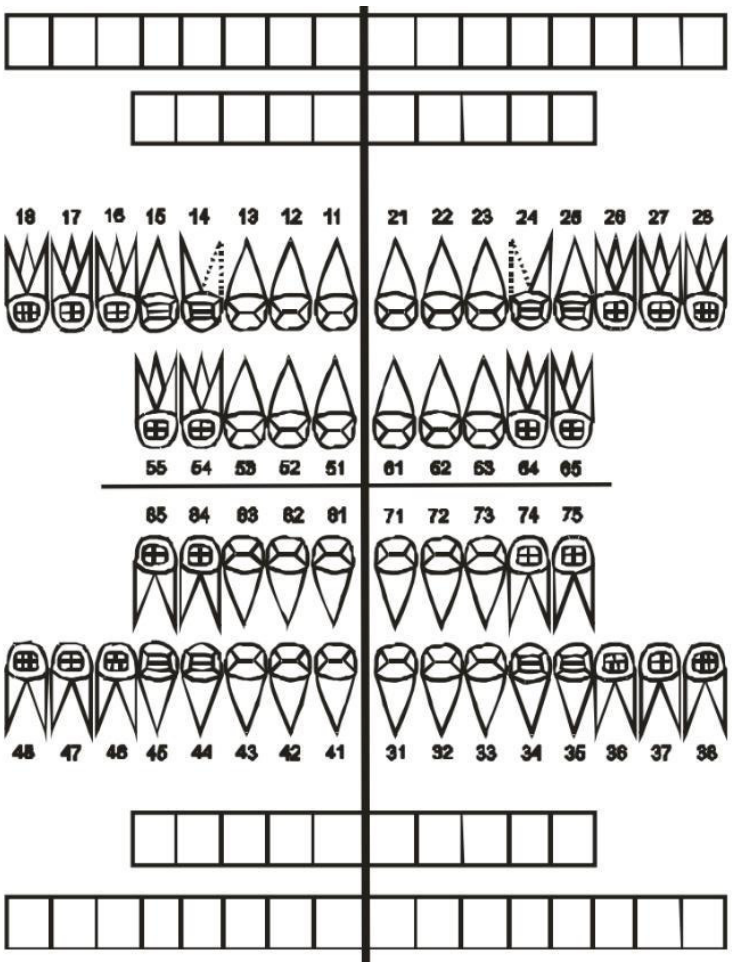
Femenino Masculino

Código de Ficha
_____

Grado: _____

Colegio: _____

Anexo 6. Historia clínica odontológica / odontograma



C	
P	
O	
D	

c	
e	
o	
d	

Anexo 7. Constancia de aprobación de Comité de Ética

Facultad de Odontología
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Comité de Ética Institucional

""Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

CONSTANCIA DE APROBACIÓN N°039-CEI-FO-2024

El Comité de Ética Institucional de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha **APROBADO** el proyecto de investigación: **"CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA ORAL USANDO TECNOLOGÍA DE OXFORD NANOPORE EN NIÑOS PERUANOS, 2024"**, a cargo de la investigadora principal **LALY ABIGAIL ROJAS RODRÍGUEZ**.

La presente aprobación del Comité de Ética Institucional de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos tiene una vigencia de tres años, del 27 de marzo de 2024 al 27 de marzo de 2026 bajo los siguientes considerandos:

- El proyecto de investigación se encuentra registrado y almacenado en los archivos digitales del comité.
- Los datos obtenidos de la investigación deberán ser rigurosamente resguardados y almacenados por un periodo mínimo de tres años pudiendo ser solicitados por este comité en cualquier momento.
- El comité se reserva el derecho de solicitar en cualquier momento un informe del avance del proceso de ejecución del proyecto de investigación
- Cualquier modificación al proyecto presentado deberá ser informado al Comité.
- Al finalizar la ejecución el investigador responsable debe enviar una copia del informe final a este comité.
- El Comité de Ética está a disposición para posteriores esclarecimientos o dudas.

Ciudad Universitaria, 27 de marzo de 2024

MSM
Firmado digitalmente por ORTIZ CULCA Fernando Alfonso FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 31.03.2024 17:48:44 -05:00

Dr. Fernando Alfonso Ortiz Culca
Presidente del Comité de Ética Institucional
Facultad de Odontología

Anexo 8. Formato del servicio prestado de la Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Anexo 7
Formato de Informe detallado del servicio prestado

Lima, 28 de octubre 2023

Informe de Actividades Realizadas

1. Datos Generales del proyecto

Título del Proyecto	Caracterización del microbioma oral con secuenciación de genomas, usando tecnología de Oxford Nanopore en niños peruanos
Numero de Proyecto	A23052141
Responsable de Proyecto	Tania Valentina Rosales Cifuentes

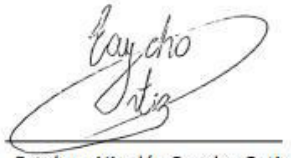
2. Datos Generales del prestador de servicio

Nombres y Apellidos	Esteban Nicolás Caycho Ortiz
Razón Social	
RUC N.°	10707821588

3. Actividades realizadas y resultados alcanzados

Actividad detallada	Lugar
• Preparación de la muestra y ensamblaje de la comunidad bacteriana. • Extracción de ADN y secuenciación genómica • Secuenciamiento y multiplexación • Análisis bioinformático	• Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular y Genética. • Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la Biodiversidad

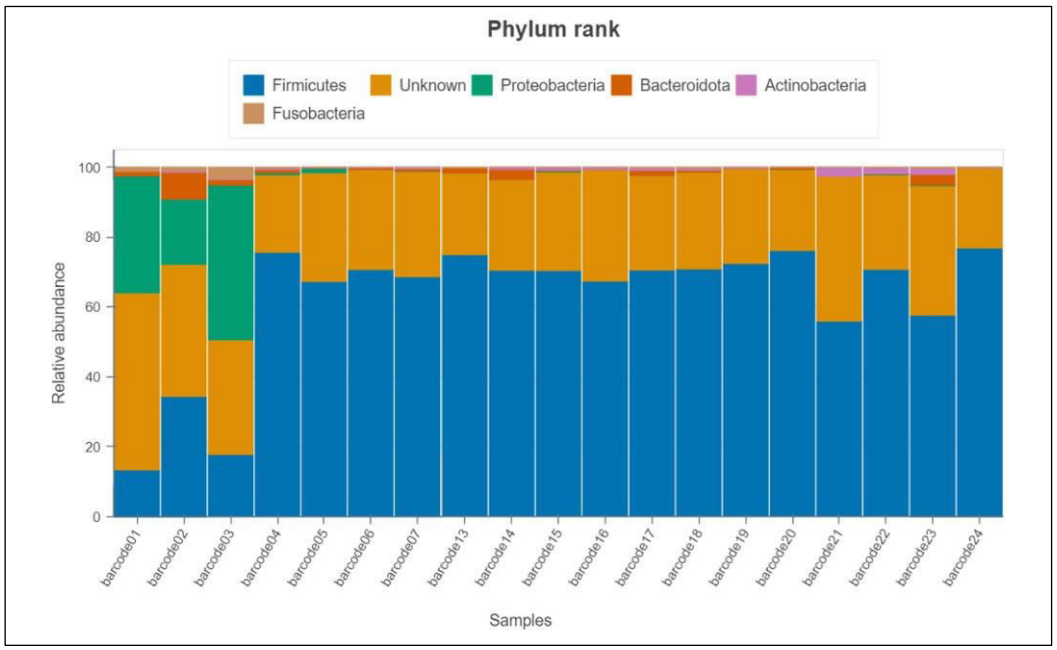
Atentamente,

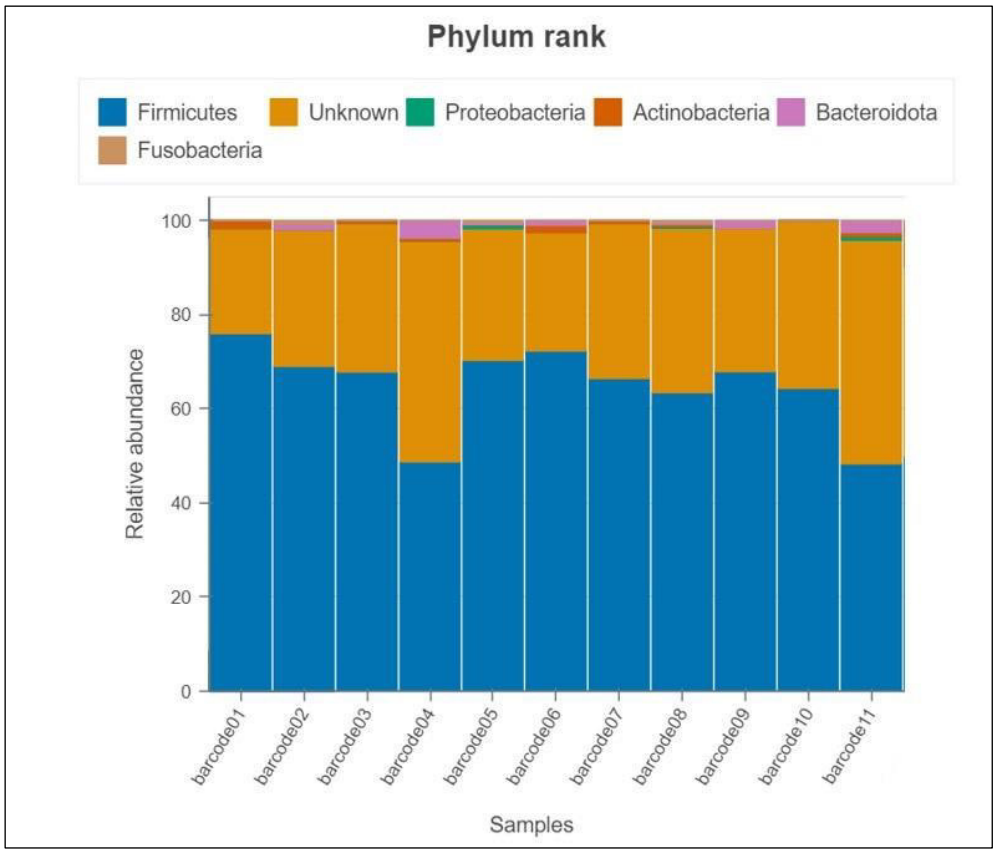


Esteban Nicolás Caycho Ortiz
DNI N.º 70782158

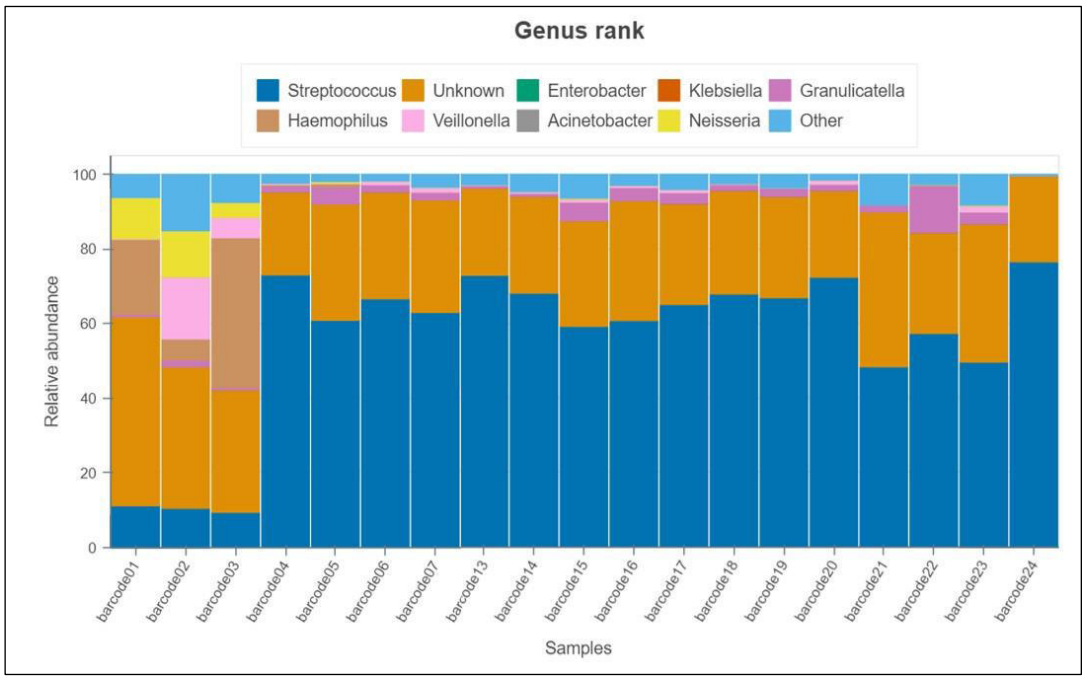
(Proveedor del servicio)

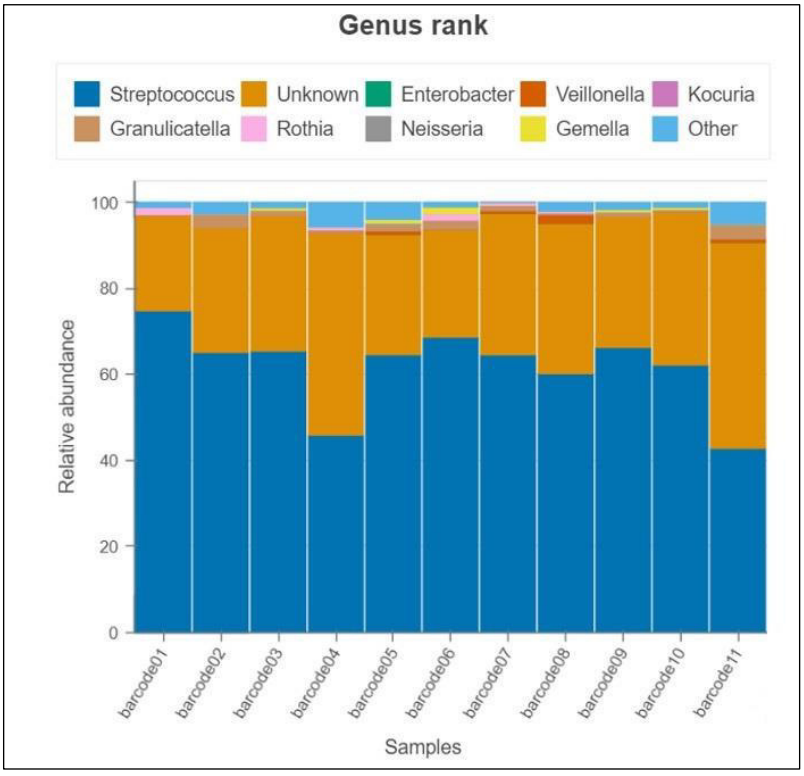
Anexo 9. Reporte de secuenciación wf-16s mediante diagrama de barras de la abundancia según *phylum*



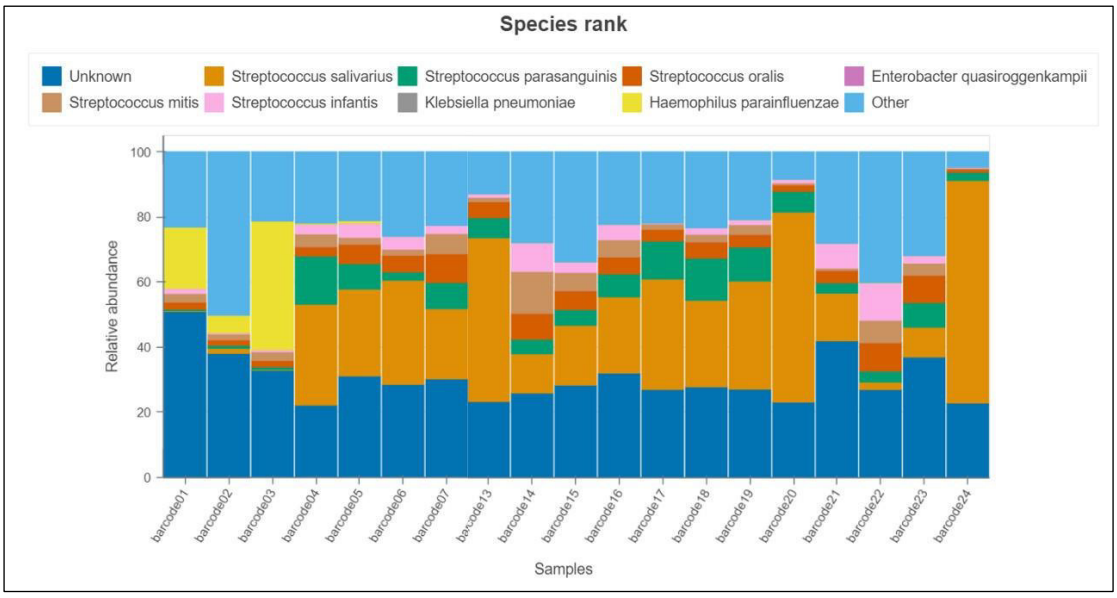


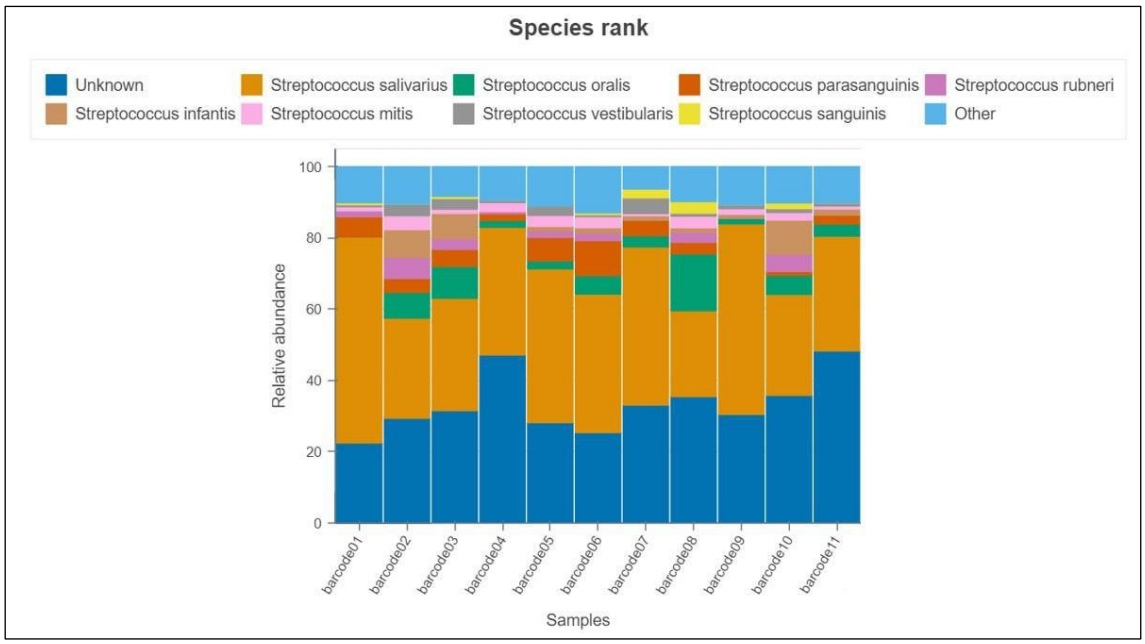
Anexo 10. Reporte de secuenciación wf-16s mediante diagrama de barras de la abundancia según género





Anexo 11. Reporte de secuenciación wf-16s mediante diagrama de barras de la abundancia según especie





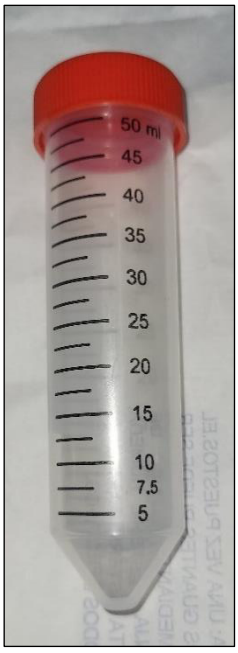
Anexo 12. Evidencias fotográficas: Recolección de muestras



I.E. N° 3036 "José Andrés Razuri"



Mesa de Trabajo



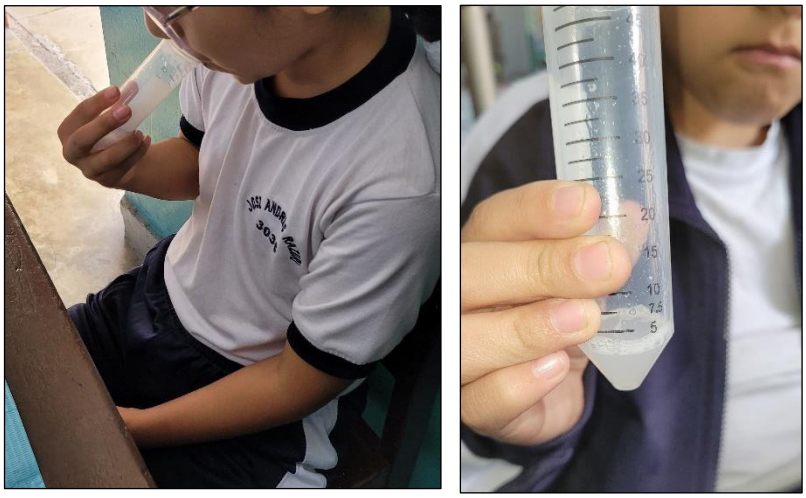
Tubo Falcon 50 ml

Marca: Globe Scientific

Nombre comercial: Diamond® Max™ Centrifuge Tubes



Evaluación oral



Recolección de las muestras biológicas (saliva no estimulada)

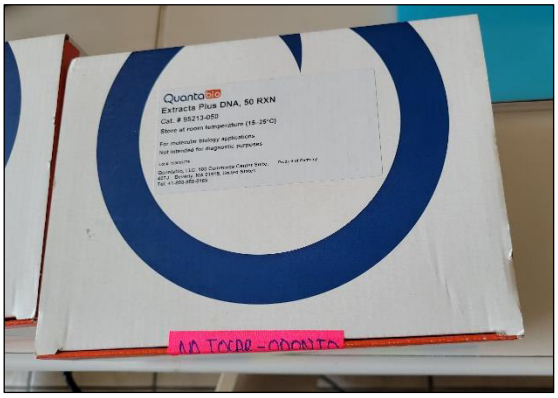


Tubos rotulados colocados en el cooler con los Ice Pack Gel



Almacenamiento de los tubos con las muestras biológicas en el laboratorio

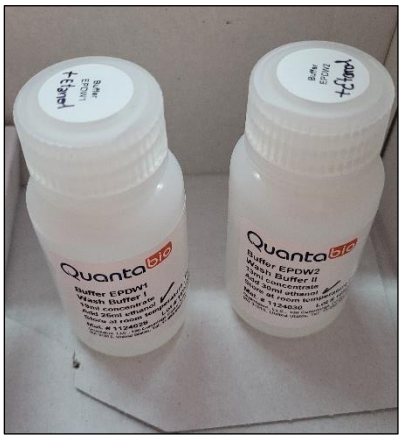
Anexo 13. Evidencias fotográficas: Extracción del ADN



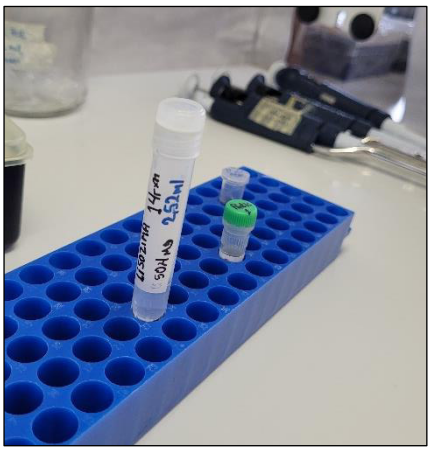
Kit Extracta Plus DNA, 50 RXN
Cat. No. 95213-050 (Quantabio)



Ambiente de trabajo aséptico



Buffer EPDW1 y EPDW2



Lisozima y Proteinasa K

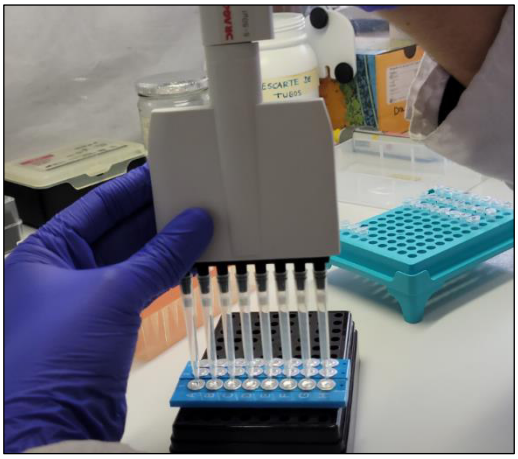


Vórtex

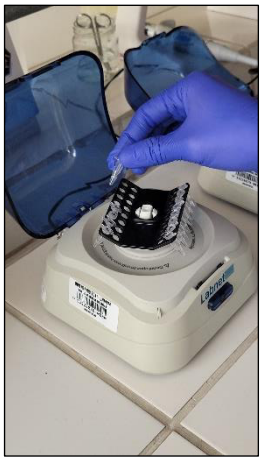


Termobloque

Anexo 14. Evidencias fotográficas: Preparación de la librería



Pipeta multicanal perforando la superficie de los Barcode 16s



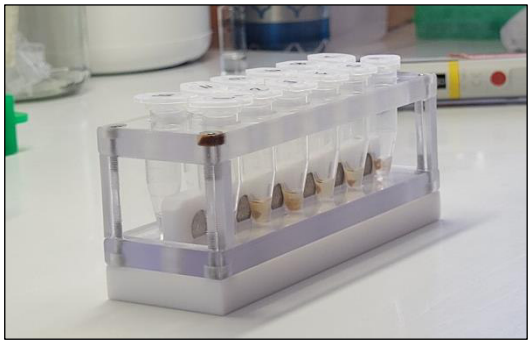
Mini spin



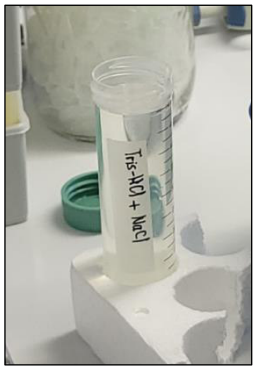
Thermal Cycler



Hula Mixer



Perlas magnéticas unidas al ADN formando un *pellet*



Tris-HCl + NaCl

Anexo 15. Evidencias fotográficas: Secuenciamiento



Secuanciador minION MK1B con la celda de flujo Flonge

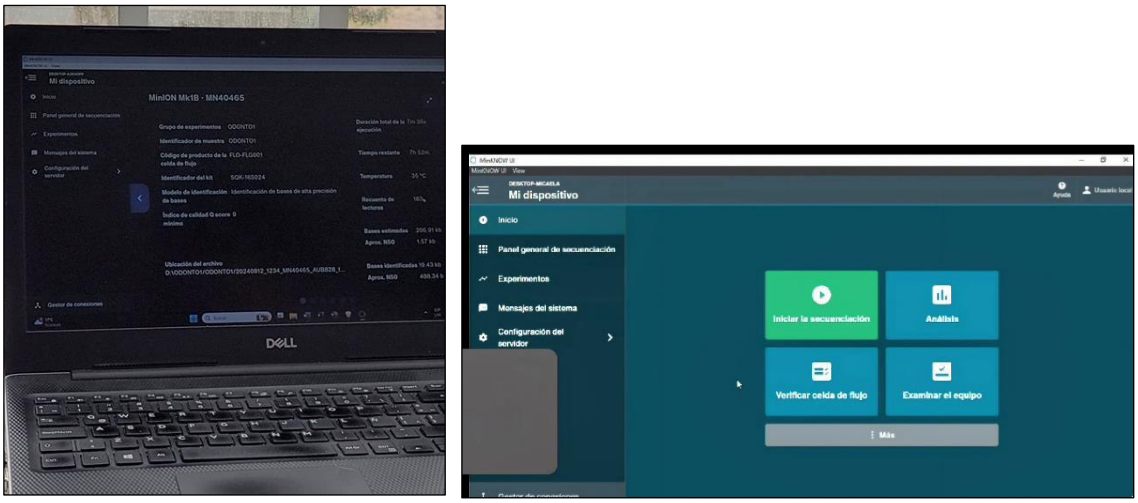


Verificación de no existir espacios de aire

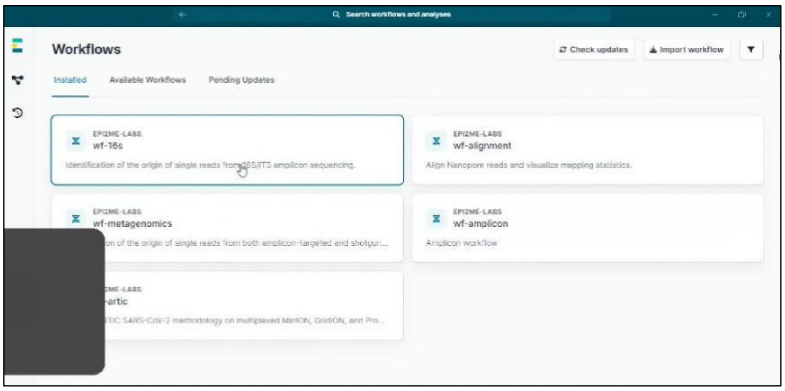


Carga de la celda de flujo Flonge

Anexo 16. Evidencias fotográficas: Procesamiento de datos



Software MinKNOW UI



Elección del portal EPI2ME



Procesamiento de los datos