

# Universidad Católica de Santa María

## Facultad de Odontología

### Escuela Profesional de Odontología



**Análisis del microbioma oral usando secuenciamiento 16s antes y después del uso de un  
dentífrico con triclosán en estudiantes del 5to año del Centro Odontológico de la Universidad  
Católica de Santa María Arequipa-2024**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Bejarano Andía, Yara Luciana**

**ORCID: 0009-0002-8820-7286**

para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

**Asesor:**

**Dr. Ponce Soto, Luis Alberto**

**ORCID: 0000-0001-5976-2913**

Arequipa – Perú

2024

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**ODONTOLOGIA**

**TITULACIÓN CON TESIS**

**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 16 de Septiembre del 2024

**Dictamen: 011481-C-EPO-2024**

Visto el borrador del expediente 011481, presentado por:

**2019204102 - BEJARANO ANDIA YARA LUCIANA**

Titulado:

**ANALISIS DEL MICROBIOMA ORAL USANDO SECUENCIAMIENTO 16S ANTES Y DESPUES DEL  
USO DE UN DENTIFRICO CON TRICLOSAN EN ESTUDIANTES DEL 5TO AÑO DEL CENTRO  
ODONTOLÓGICO DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA AREQUIPA - 2024**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

**CIRUJANO DENTISTA**

**29286016 - ALVARADO ACO ALBERTO ARMANDO  
DICTAMINADOR**



**29716878 - PORTILLA MIRANDA SEREY DORIS  
DICTAMINADOR**



**30862017 - FIGUEROA BANDA RUFO ALBERTO  
DICTAMINADOR**



# Análisis del microbioma oral usando secuenciamiento 16s antes y después del uso de un dentífrico con triclosán en estudiantes del 5to año del Centro Odontológico de la Universidad Católica de Santa Ma

## INFORME DE ORIGINALIDAD

22%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

12%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	6%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	www.scribd.com Fuente de Internet	1%
4	m.moam.info Fuente de Internet	1%
5	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1%
7	lpsn.dsmz.de Fuente de Internet	1%

## DEDICATORIA

Para papi y mami, que siempre creyeron mucho más en mí de lo que yo lo hacia

Porque es más fácil ser valiente cuando sé que están a mi lado.



## AGRADECIMIENTO

Primero quiero agradecer a Dios porque sus tiempos siempre son perfectos, A mis padres por apoyarme en mi educación y crecimiento profesional, y sobre todo por formar a una buena persona, a mis doctores por creer en mi capacidad y darme la confianza para saber lo lejos que puedo llegar como persona y como profesional, a mis personas que me vieron y me ven crecer y siempre son mi soporte, los amo y siempre estaré agradecida.



## EPÍGRAFE

Nos envejece más la cobardía que el tiempo.  
Los años solo arrugan la piel, pero el miedo  
arruga el alma.

Facundo Cabral

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el microbioma oral obtenido de la saliva antes y después de la aplicación de una crema con triclosán. Cinco sujetos de estudio fueron escogidos con un índice de CPOD bajo donde fue recolectado una muestra de saliva y el cepillo dental para procesamiento microbiológico, luego se dio la pasta con triclosán y se recolecto nuevamente una muestra de saliva y el cepillo dental.

A la muestra de saliva se le extrajo el ADN que paso por un proceso de secuenciamiento usando la subunidad 16S. Los cepillos dentales fueron procesados microbiológicamente en caldo sacarosa con bacitracina e incubados por 5 días para poder observar la formación de colonias en las cerdas de *Streptococcus mutans*.

**Resultados:** Antes del uso de la crema con triclosán encontramos las siguientes bacterias:

*Streptococcus parasanguinis*, *Okadaella gastrococcus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus genomsp*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus iniae*, *Swine manure*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus pneumoniae*.

Después del uso de la crema con triclosán encontramos las siguientes bacterias:

*Streptococcus rubneri*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus mitis*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Swine manure*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus devriesei*, *Streptococcus parauberis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus porci*, *Streptococcus plurextorum*, *Streptococcus Henry*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus Anginosus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus cuniculli*, *Streptococcus azizii*, *Streptococcus moroccensis*.

Los resultados de los cepillos dentales mostraron que hay una significativa reducción de las bacterias después de la aplicación de la pasta con triclosán.

**Conclusión:** La pasta triclosán baja el número de bacterias, pero no las elimina.

**Palabras clave:** Microbioma, 16S, Triclosán.

## ABSTRACT

In the present research work, the oral microbiome obtained from saliva before and after the application of a cream with triclosan was evaluated. Five study subjects were chosen with a low CPOD index where a saliva sample and toothbrush were collected for microbiological processing, then the paste with triclosan was given and a saliva sample and toothbrush were collected again.

DNA was extracted from the saliva sample and sequenced using the 16S subunit. The toothbrushes were microbiologically processed in saccharose broth with basitracin and incubated for 5 days in order to observe colony formation in *Streptococcus mutans* bristles.

Portuguese in Africa is spoken in several African states and is the official language in five of these: Angola, Mozambique, Guinea-Bissau, Cape Verde, Sao Tome and Principe. There are Portuguese-speaking communities in most southern African countries, a mixture of Portuguese settlers and Angolans and Mozambicans who left their countries during the civil wars.

Results: Before the use of the cream with triclosan we found the following bacteria:

*Streptococcus parasanguinis*, *Okadaella gastrococcus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus genomosp*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus iniae*, *Swine manure*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus pneumoniae*.

After the use of the cream with triclosan we found the following bacteria:

*Streptococcus rubneri*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus mitis*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Swine manure*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus devriesei*, *Streptococcus parauberis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus porci*, *Streptococcus plurextorum*, *Streptococcus Henryi*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus Anginosus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus cuniculli*, *Streptococcus azizii*, *Streptococcus moroccensis*.

The results of the toothbrushes showed that there is a significant reduction of bacteria after the application of the paste with triclosan.

**Conclusion:** Triclosan paste lowers the number of bacteria, but does not eliminate them.

**Key words:** Microbiome, 16S, Triclosan.

## ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
EPÍGRAFE	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	2
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
1.1. Determinación del problema .....	2
1.2. Enunciado del problema .....	3
1.3. Descripción del problema.....	3
1.4. Justificación .....	5
2. OBJETIVOS .....	6
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. Esquema de conceptos básicos .....	6
3.2. Análisis de antecedentes investigativos.....	15
3.2.1. Antecedentes internacionales.....	15
3.2.2. Antecedentes nacionales.....	20
4. Hipótesis: .....	21
5. Hipótesis nula:.....	21
CAPÍTULO II .....	23
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL .....	23
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN.....	23
1.1 Técnica.....	23
1.2 Instrumento .....	24
2.CAMPO DE VERIFICACIÓN .....	25
2.1 Ubicación espacial .....	25
2.2 Ubicación temporal .....	25
2.3 Unidades de estudio .....	25
3 RECURSOS.....	27
3.1 Recursos humanos.....	27
3.2 Recursos virtuales .....	27
3.3 Recursos Físicos .....	27
3.4 Recursos económicos .....	28
3.5 Recursos institucionales .....	28
4 ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS .....	29
4.1 Tipo de procesamiento .....	29
4.2 Operaciones del procesamiento .....	29

4.3 Plan de análisis de datos .....	29
CAPÍTULO III.....	31
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIONES .....	51
RECOMENDACIONES .....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
Anexos .....	58



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 .....	32
Gráfico del árbol filogenético muestra I .....	32
GRÁFICO 2 .....	34
Gráfico del árbol filogenético muestra II .....	34
GRÁFICO 3 .....	36
Gráfico del árbol filogenético muestra III .....	36
GRÁFICO 4 .....	38
Gráfico del árbol filogenético muestra IV.....	38
GRÁFICO 5 .....	40
Gráfico del árbol filogenético muestra V.....	40
GRÁFICO 6 .....	42
Gráfico del árbol filogenético muestra VI .....	42
GRÁFICO 7 .....	44
Gráfico del árbol filogenético muestra VII .....	44
GRÁFICO 8 .....	46
Gráfico del árbol filogenético muestra VIII .....	46





# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO TEÓRICO**

## INTRODUCCIÓN

El análisis del microbioma oral utilizando secuenciación 16s es un método potente que permite analizar y estudiar la composición y la variedad de las bacterias presentes en la boca.

El gen 16S ribosomal ARNr es ampliamente utilizado en este tipo de investigación debido a su preservación en las diferentes especies bacterianas y a sus zonas hipervariables que dejan distinguirse entre ellas.

La secuenciación 16S trata de ampliar y secuenciar una región específica del gen 16S ARNr actual en el ADN extraído de los especímenes de la cavidad bucal.

Esta área contiene información que deja identificar y clasificar las bacterias presentes en la muestra. Esta perspectiva ha revolucionado nuestra comprensión del microbioma oral, evidenciando la diversidad y complejidad de las comunidades bacterianas presentes en la cavidad oral.

Este procedimiento ha renovado nuestra comprensión del microbioma oral y su función en la salud de la boca, no obstante, es necesario saber que el estudio del microbioma de la boca es un campo en constante variabilidad y evolución, es necesario incentivar a realizar más investigaciones para entender totalmente su importancia clínica y rehabilitadora.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO TEÓRICO

#### 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

##### 1.1. Determinación del problema

El triclosán es un agente antimicrobiano que se encuentra habitualmente en productos de cuidado personal, incluido en las pastas dentales, sin embargo, el uso de dentífricos que contienen triclosán ha sido un tema de interés en el estudio de los efectos sobre el microbioma oral, ya que su función es prevenir la proliferación de bacterias, uno de los métodos utilizados para analizar el microbioma es la secuenciación 16S, que se centra en el gen del ARN ribosómico subunidad 16S para identificar y clasificar bacterias.

Al secuenciar la subunidad 16S ARN presente en las bacterias presente en los dentífricos con triclosán, es posible identificar las especies bacterianas presentes y evaluar los posibles efectos del triclosán en la composición del microbioma oral. El gen 16S del ARN ribosomal es una herramienta fundamental para estudiar comunidades microbianas, ya que está presente en todas las bacterias y contiene regiones variables que facilitan la clasificación e identificación a nivel de género y especie.

## 1.2. Enunciado del problema

“ANÁLISIS DEL MICROBIOMA ORAL USANDO SECUENCIAMIENTO 16S ANTES Y DESPUÉS DEL USO DE UN DENTRIFICO CON TRICLOSAN EN ESTUDIANTES DEL 5TO AÑO DEL CENTRO ODONTOLÓGICO DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA AREQUIPA 2024”

## 1.3. Descripción del problema

### 1.1.3. Área del conocimiento

- **Campo** : Ciencias de la Salud
- **Área** : Odontología
- **Especialidad** : Preventiva
- **Línea** : Higiene Oral

### 1.1.4. Operacionalización de variables

VARIABLES	INDICADORES	CATEGORIAS	INSTRUMENTO
<b>Independiente</b> <b>Pastas dentales</b>	<b>Colgate</b>	<b>Cualitativa</b>	<b>Colgate total: triclosán</b>
<b>Dependiente</b> <b>Microbioma oral</b>	<b>Árbol filogenético</b>	<b>Cualitativo</b>	<b>16S</b>

### 1.1.5. Interrogante principal

- ¿Habrá diferencia del microbioma después del uso de la pasta con triclosán?

### 1.1.6. Interrogantes Específicos

- ¿Cuál es el microbioma oral antes del uso de un dentífrico con triclosán?
- ¿Cuál es el microbioma oral después del uso de un dentífrico con triclosán?

### 1.1.7. Taxonomía de la Investigación

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	Por la técnica de recolección	Por inferencia del investigador	Por el tipo de dato	Por el número de mediciones	Por la técnica de recolección		
<i>Cualitativo</i>	<i>Campo</i>	<i>Analítico</i>	<i>Numérico</i>	<i>Transversal</i>	<i>Laboratorial</i>	<i>Cuasi-Experimental</i>	<i>Cuasi-Experimental</i>

#### 1.4. Justificación

##### a. Relevancia Científica:

Con el presente estudio de investigación se verificará si existe una reducción del microbioma ubicado en el cepillo dental teniendo como muestra el uso de pasta dental con triclosán, con la finalidad de contribuir con la información preventiva para evaluar la eficacia de los dentífricos en la promoción de una salud oral óptima.

##### b. Originalidad:

Es un estudio original porque no hay estudios en nuestra facultad que hayan podido determinar el impacto de reducción del Microbioma del cepillo con el uso de la pasta dental con triclosán.

##### c. Interés Personal:

Cooperar en las investigaciones que rinde nuestra universidad relacionada con la preventiva, para poder tener un mejor manejo y evaluación de esta, por otro lado mi incentivo es poder concluir la etapa pre grado en lo que concierne mi carrera universitaria.

##### d. Viabilidad:

Es posible tener una viabilidad para la obtención de una población y muestra, ya que el estudio va dirigido a mis compañeros de 5to año de la facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María, por lo tanto, podré llevar a cabo un análisis cooperativo y realizar un estudio de campo.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL

- Determinar la diferencia del microbioma oral, después del uso de la pasta con triclosán.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar el microbioma oral antes del uso de una pasta dental con triclosán.
- Determinar el microbioma oral después del uso de una pasta dental con triclosán.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1. Esquema de conceptos básicos

#### 3.1.1 Microbioma

El microbioma de los seres humanos es un ecosistema que está formado por el hombre y los microorganismos que en él habitan, estos microorganismos son esenciales para preservar la salud (1). Con la ayuda del sistema inmunológico nos cuidan de patógenos invasores y preservan nuestra salud (2).

Se conoce como microbioma a microorganismos que dominan y se establecen de manera fisiológica en el ser humano. Se construye desde la genética, edad, dieta y la interacción con el medio ambiente, es por eso que cada persona tiene su propio microbioma, este se establece en diferentes zonas del cuerpo: oral, respiratoria, intestinal, piel, vaginal o tracto urogenital.

El microbioma está en constante interacción con el medio ambiente, un cambio en su composición o funcionalidad podría producir modificaciones en la respuesta inmune y causar

enfermedades (3).

La cavidad oral, implica un 25% del microbioma del ser humano y compuesta de dientes, surco gingival, lengua, mejillas, paladar duro y blando, invadido por bacterias que mayormente están presentes como biopelículas bacterianas, estos ambientes son favorables para que el microorganismo pueda florecer (4). El microbioma oral es uno de los microbiomas mas caracterizados de lo que colonizan al hombre. Con sus diferentes nichos, la cavidad oral es un entorno muy complejo, ya que diversos microbios colonizan diferentes hábitats y su identidad microbiana que consta de su propia y singular comunidad (5).

El "Human Oral Microbiome Database" hay aproximadamente 700 especies procariotas (5).

El microbioma oral fue reconocido por primera vez por el holandés Antony Van Leeuwenhoek, empleando un microscopio armado por él (4).

El microbioma oral se describe como el genoma colectivo de los microorganismos, ubicado en la boca. El genoma es el componente genético de un organismo, grupo completo de ADN (4).

Es la segunda microbiota más grande y diversa luego del intestino (5).

El microbioma del ser humano consta de un microbioma central y variable. El central está en todos los individuos, por otro lado, el variable es exclusivo según el estilo de vida y las diferencias fisiológicas (4).

La temperatura normal de la boca en promedio es 37 grados centígrados, lo que favorece a las bacterias un ambiente inalterable para sobrevivir. Por otro lado la saliva tiene un pH normal de 6.5 a 7, pH favorable para una gran cantidad de bacterias (4).

### 3.1.2 Desarrollo del Microbioma Oral

Al nacer el recién nacido, entra en contacto con la microflora del útero y la vagina durante el parto, para después entrar en contacto con los microorganismos de la atmósfera al nacer, poco después empieza la invasión de microorganismos, los invasores principales se les conoce como especies pioneras, invadido principalmente por aerobios en el transcurso del primer año puede incluir *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria* y *Veillonella* (4).

Al iniciar la erupción de los dientes, los microorganismos pueden invadir las zonas que no se desprenden, sin embargo, existen más zonas para la colonización después de la erupción de todos los dientes.

El incremento de grietas gingivales se establece para la colonización de microbios periodontales. El almacenamiento de placa se puede observar en diferentes zonas del diente, tanto en superficies lisas como en fosas y fisuras. Con el envejecimiento, con la ausencia de todas las piezas dentarias, la flora se vuelve similar a la de un niño antes de la erupción dental (4).

El origen y evolución de las comunidades está dirigida por factores como la adherencia a la superficie de los dientes o al epitelio, la unión particular de célula a célula como motor para la formación temprana de la comunidad de microorganismos que conducen a variaciones en el entorno es lo que representa el inicio hacia las enfermedades de la cavidad oral (4).

### 3.1.3 Composición del Microbioma Oral

En la boca tenemos una amplia gama de microorganismos.

La comunidad de la cavidad oral es compleja y forma un entorno rico con nichos distintivos que favorecen a un entorno para la colonización de los microbios (4).

El microbioma normal consta de bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoos, no obstante, no existe mucha información sobre el microbioma fúngico.

Se reconocen aproximadamente 700 especies de procariotas, estas pertenecen a 185 géneros, de las cuales 54% tienen nombre oficial, 14% no tiene nombre, pero pueden cultivarse, y 32% conocidos como los no cultivados (4).

La lengua tiene abundantes papilas con pocos sitios anaeróbicos, este mismo hecho hace que la lengua pueda albergar una microflora variada.

El microbioma oral tiene la posibilidad de presentar cambios en la composición por varios

factores: frecuencia temporal del huésped, dieta, cambios de pH, interacciones entre bacterias, mutaciones genéticas (4).

Las poblaciones de microorganismos no causan daño y mantienen un control sobre especies patógenas al no permitir que se peguen a la mucosa. Estas bacterias se transforman en patógenas al traspasar la barrera, causando enfermedades e infecciones. Los géneros bacterianos más importantes que se encuentran en la cavidad oral sana son:

- GRAM POSITIVA:

COCOS: *Abiotrophia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Stomatococcus* .

BASTONES: *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Rothia*.

- GRAM NEGATIVA:

COCOS: *Morexella*, *Neisseria*, *Veillonella*.

BASTONES: *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Hemophilus*, *Leptotrichia*, *Provetella*, *Selomonas*, *Simonsiella*, *Treponema*, *Wolinella*.

### 3.1.4 Funciones del Microbioma Oral

Su fisiología y ecología están profundamente conectadas con las del huésped. El microbioma repercute en la promoción de la salud o el aumento de la enfermedad, ejerce un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la cavidad oral, el cuidado de la boca y la predisposición de desarrollo de enfermedades.

Saber la identificación del microbioma y sus vecinos con los que se comunica son necesarios para la comprensión mecánica.

Por otro lado las comunidades microbianas que están en otras zonas del cuerpo, realizan funciones críticas, fisiológicas, metabólicas e inmunológicas, que aportan en la digestión de alimentos, nutrición, generan energía, diferenciación y maduración de la mucosa del huésped y su sistema inmunológico (4).

### 3.1.5 Proyecto del Microbioma Humano

En el año 2008, el instituto Nacional de Salud presentó el proyecto Microbioma Humano (HMP), admitiendo la importancia de estudiar el microbioma, el progreso en bioinformática, modernizó la capacidad de estudiar el microbioma Humano, de esta manera se pudo lograr en grandes cantidades más estudios de la genómica y metagenómica que estudian y analizan la función de los microbios en diferentes ecosistemas (4).

El proyecto del Microbioma Humano recopila un protocolo no invasivo para tomar patrones del microbioma de la cavidad oral (5).

Al entender que más del 99% de los microbios no podían cultivarse de una manera sencilla, se empezó a desarrollar enfoques para estudiar los microorganismos, mayormente a través de la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S que permite evidenciar la diversidad del componente bacteriano del microbioma oral (5).

Este procedimiento no facilita información necesaria para detectar microorganismos o virus eucariotas.

### **3.1.6 Base de datos del Microbioma Oral Humano**

La base de datos del Microbioma Oral Humano (HOMD), provee un almacenamiento de secuencias de genoma de bacterias orales y un sumario prolijo que trata de descripciones de taxones de bacterias orales, un instrumento de identificación de ARNr 16S. (4)

La base de datos del Microbioma Oral Humano se crea con el propósito de brindar información completa a los grupos científicos. El HOMD abarca información de alrededor de 772 especies procariotas, un 70% es cultivable y el restante (30%) pertenece a la clase de microorganismos no cultivables (4).

### **3.1.7 Genoma**

Es el elemento genético de un organismo, es el ADN completo, incluyendo todos los genes (4).

El ADN contiene una conformación bicatenaria vigente en el interior del núcleo que manda toda la data genómica heredada (6).

La genómica y la transcripción proveen la secuenciación del ADN (7).

La secuenciación del genoma completo se investigó hace muy poco tiempo, aunque de una manera superficial y en una cantidad relativamente menor en la cavidad oral, el microbiota oral es un gran reto computacional (5).

La forma de investigación que ha aparecido para identificar la apariencia de microbios en el cuerpo humano y entender la naturaleza del movimiento del microbioma en la salud y enfermedad es la metagenómica (4).

- **METAGENOMICA**

El desarrollo de la genómica actual se puede explicar como el progreso de los conocimientos de secuenciación de genomas completos, de esta manera ha generado una nueva forma de ver el análisis de las poblaciones bacterianas, porque el entendimiento del total de los genes encontrados dentro del genoma de una especie nos sirve para estudiar caracteres fisiológicos desconocidos actualmente (4).

La metagenómica es un grupo de técnicas que identifican bacterias que no son fáciles de cultivar.

Además, reconocen la variedad genómica de los microbios utilizando el poder de análisis genómico a toda la población de microbios (4).

La parte más importante de la genómica es la de brindar la capacidad de describir de forma global la diversidad genética en las muestras que se presentan, además del potencial funcional por medio de análisis de genes con rutas metabólicas (4).

El análisis total de genomas se hace formando una biblioteca de clones, de tal manera se hace la amplificación por PCR de casi todos los genes y después su secuenciación, posteriormente a través de programas informáticos, las secuencias se ordenan y se forma un árbol filogenético, en donde las secuencias quedan unidas en OTUs (unidades taxonómicas operativas) (4).

En el presente la era molecular nos da acceso para poder reconocer microorganismos a través de su huella genética, todo esto a través de la metagenómica (3).

Para poder estudiar el microbioma en una muestra biológica, se divide el ADN que es obtenido, se amplían y se secuencian los genes que codifican para la subunidad 16S, vigente en todas las bacterias actuales donde su estructura y función son firmes a lo largo del tiempo (3).

- **PROTEOMICA**

“Proteoma” fue dicho por Marc Wilkins en la fecha de 1994, para explicar que son todas las proteínas que se encuentran en un genoma, da el perfil de proteínas totales de un microorganismo o célula (7).

La genómica junto con la transcriptómica son las encargadas de proporcionar la secuencia de ADN, los factores reguladores y la expresión del gen (7).

En otras palabras la proteómica es una representación de las proteínas manifestadas in vitro por un genoma en diferentes condiciones fisiológicas, lo que nos brinda una vista de los cambios fenotípicos que soporta un microorganismo en función de las situación en la que estén (7).

### 3.1.8 ARNr 16S

En estudios de filogenética y taxonomía el ARN ribosómico 16S es la macromolécula más utilizada, su análisis se utiliza para fijar las relaciones filogenéticas dentro de las procariotas, estableciendo un gran impacto en su evolución y en resultado su identificación y clasificación bacteriana (8).

Se utilizo la secuencia en métodos de bajo rendimiento para diferenciar cepas, en polimorfos dentro del gen, los que solo eran de un solo núcleo fueron utilizados para seguir cepas de importancia clínica (9).

Es un polirribonucleótido (grupo de 13 o más ribonucleótidos), codificado por el gen ADN ribosomal, en donde podemos obtener información filogenética y taxonómica, esta se expande en una cadena secundaria con la diferencia que tiene la presencia de segmentos de doble cadena, junto con cadenas simples (8).

Su análisis se usa para identificar la variedad del microbiota oral, junto a sus relaciones filogenéticas.

Los genes ribosomales tienden a estar más aptos que una gran cantidad de los genómicos, ya que presentan una mayor comunicación taxonómica que las hibridaciones DNA-DNA (4).

Lo fascinante del gen 16S ARNr es su potencial para guardar regiones conservadas y regiones variables que ayudan a distinguir organismos a diferentes niveles filogenéticos, usando cebadores universales de zonas conservadas a ambos lados del gen (4).

Usando el PCR se puede lograr amplificar el gen 16ARNr, el material amplificado se secuencia y se confronta con otras secuencias que están en la base de datos, estas bases

actualmente incluyen más de 3 millones de secuencias del gen 16S.

La existencia de una o más secuencias características se les conoce como oligonucleótidos, son secuencias cortas que se muestran en la mayor parte de un determinado grupo filogenético, por eso nos ayudan a reconocer a cada bacteria dentro de su grupo (8).

El gen 16S facilita una mejor resolución taxonómica, el gen 16S de 1500 pb contiene 9 regiones móviles intercaladas a lo largo de la secuencia 16S (9).

Cuando se determina la secuencia de nucleótidos y se visualizan las comparaciones, será el porcentaje de igualdad o similitud entre las secuencias ADNr 16S de dos bacterias lo que señale su relación evolutiva. No hay que olvidar que gracias al análisis comparativo nos ayuda a formar arboles filogenéticos, que muestran gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, reflejando su posición evolutiva.

Por otro lado, la comparación de genomas completos la que brinda una indicación exacta de las relaciones evolutivas (10).

### **3.1.9 Ribosomas**

Orgánulos complejos, que utilizan los organismos para el proceso de síntesis de proteínas, el coeficiente que presenta el ribosoma bacteriano es de 70S (unidades sverderg), esta se puede dividir en subunidad grande 50S y subunidad pequeña 30S, estas subunidades están formadas de un complejo ribonucleoproteico formado de proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr (8).

El ARNr 16S contiene la subunidad pequeña además de 21 proteínas diferentes. Por otro lado en bacterias, el ARN ribosomal codificado por genes están compuestos por operones (grupo de genes que se transcriben desde la misma región promotora) (8).

### **3.1.10 Aplicaciones de la secuenciación del ARNr 16S en el diagnóstico microbiológico**

La descripción basada en la secuenciación del gen 16S se concentra en las cepas cuyos rasgos para identificarlos resulta imposible, o requiere un tiempo prolongado, incluyendo estos casos (8).

- Bacterias no cultivables vigentes en muestras clínicas.
- Bacterias donde sus características bioquímicas no se ajustan a las de ningún género reconocido, ejemplos patógenos nuevos.
- Bacterias que necesiten requerimientos nutricionales
- Bacterias con un desarrollo lento.

### **3.1.11 Bioinformática**

Campo que se concentra en el uso de la ciencia de la información para solucionar problemas biológicos, es la especialidad que combina matemáticas, biología y informática. Encargado de seleccionar, guardar, recuperar y analizar la base de datos. Esta puede auxiliar a la investigación en odontología entender sus vías y mecanismos en diferentes enfermedades bucales, siempre y cuando se comprenda los sistemas biológicos, algoritmos y estadísticas (11).

#### **3.1.11.1 Herramientas y técnicas en bioinformática**

- **Alineamiento**

Es la diferencia de residuos entre secuencias, se logra alineando la secuencia diferente con una o más secuencias conocidas para pronosticar las porciones comunes (11).

Los residuos parecidos tienen funciones estructurales y funcionales semejantes y son conservados por la selección natural de la evolución. El alineamiento óptimo tiene dos o más secuencias para que coincidan un número máximo de residuos similares, estas pueden ser secuencias de ADN o ARN o de aminoácidos (11).

Existen dos formas de alineación de secuencias: por pares (PSA) y secuencias múltiples (MSA).

Por pares (PSA), examina dos secuencias al mismo tiempo, mientras tanto el MSA enfila más de dos secuencias relacionadas. El más favorecedor es el MSA ya que examina diversos miembros de una familia de secuencia, aportando más información biológica (11).

Las proteínas conocidas como moléculas biológicas llevan información estructural y eficaz, por lo tanto, su alineación de secuencias a nivel de aminoácidos es más fundamental.

La alineación global se hace a través de secuencias con longitud semejante y una alineación a lo largo. El alineamiento local se ejecuta para examinar regiones locales semejantes entre las secuencias, cuando existe una gran desigualdad en las longitudes de secuencias a confrontar,

se realiza una alineación local (11).

- **Análisis Filogenético**

El árbol filogenético, facilita una representación visual de la organización de ramificación esperado de los grupos taxonómicos, también es útil para resolver relaciones entre una compilación de virus, bacterias, especies u otros grupos taxonómicos funcionales, cumplen un papel importante en el reconocimiento de subtipos virales y nuevos subtipos recombinantes, que nacen de mezclas de subtipos conocidos. Se emplean métodos probabilísticos para resolver la ramificación y el espacio entre ramas, las fuerzas como la recombinación, selección y mutación perjudican los datos genéticos de un árbol establecido (11).

### 3.1.12 Pastas Dentales

Los dentífricos, tanto en pasta como en gel son utilizados junto al cepillo dental ayudando a conservar y regenerar la salud bucal. Su formulación a evolucionado satisfactoriamente desde formulaciones con ingredientes simples hasta complejas y modernas. Estos pueden estar formados para contrarrestar caries dental, enfermedades periodontales, olor desagradable, erosión, hipersensibilidad de la dentina de los dientes (12).

Los dentífricos más eficientes son aquellos que están formados para alcanzar el máximo de sus funciones, llamadas también pastas modernas (12).

Los dentífricos modernos son importantes para anticipar tanto enfermedades de las encías como la caries, a esto debemos añadir renovar la remineralización dental, prevenir de la desmineralización dental, el manejo de antibacterianos y el descarte eficiente de la placa dental con abrasivos (13).

## 3.2. Análisis de antecedentes investigativos

### 3.2.1. Antecedentes internacionales

**Título:** Cambios funcionales en el microbioma oral después del uso de dentífricos que contiene fluoruro y arginina: un estudio metagenómico y meta transcriptómica.

**Autor:** Miguel Carda – Diéguez, Rebecca Moazzez, Alex Mira.

**Resumen:** La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes en todo el mundo y un cepillado eficiente con un dentífrico que contenga flúor se considera fundamental para

prevenirla. Los dentífricos que contienen fluoruro se han estudiado ampliamente en relación con la resistencia del esmalte a la desmineralización. La arginina también se ha propuesto como un prebiótico prometedor. Aquí presentamos los primeros análisis metagenómicos (secuenciación de ADN de toda la comunidad microbiana) y metatranscriptómico (RNA de la misma comunidad) , para evaluar el efecto del cepillado con flúor y flúor más arginina que contienen los dentífricos sobre la composición y actividad microbiana oral.

Se inscribieron 53 pacientes en un estudio de intervención clínica longitudinal, incluidos 26 adultos con caries activas y 27 adultos sin caries. Después de un periodo de lavado mínimo de 1 semana, se recolectaron muestras de placa dental posterior al lavado, 3 meses después del uso del dentífrico con fluoruro y después de 6 meses de usar dentífrico con fluoruro con arginina al 1.5%.

**Resultados:** Hubo un cambio tanto en la composición como en la actividad del microbioma de la placa después de 3 meses de cepillado con la pasta dental que contiene fluoruro en comparación con las muestras recolectadas en el periodo de 1 semana posterior al lavado, tanto para varias bacterias asociadas a la salud y la periodontitis. Más de 400 genes cambiaron de proporción en el metagenoma, y entre 180 y 300 genes cambiaron a su nivel de expresión dependiendo de si se analizaron sitios libres de caries o sitios activos con caries. El metagenoma y el metatranscriptoma también cambiaron después de que los sujetos se cepillaron con el dentífrico Fl+ Arg. La riqueza y diversidad bacteriana no se vieron afectadas por ninguno de los dos tratamientos del estudio.

**Conclusiones:** Nuestros datos demuestran que el uso a largo plazo de ambos dentífricos probados cambia la composición bacteriana y los perfiles funcionales de la placa dental humana hacia una comunidad microbiana más saludable, tanto en sitios libres de caries como en sitios activos con caries.

Esta observación fue especialmente evidente para el dentífrico Fl + Arg. Por lo tanto, concluimos que los beneficios preventivos del cepillado dental van más allá de la eliminación física de la placa dental y que los ingredientes activos (14).

**url:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36171634/>

**Título:** Evaluación de la secuenciación del gen 16S rRNA para análisis del microbioma a nivel de especies y cepas

**Autor:** Jethro S. Johnson, Daniel J. Spakowicz, Bo-Young Hong, Lauren M. Petersen, Patricio Demkowicz, Lei Chen, Shan R. Leopold, Blake M. Hanson, Hanako O Agresta, Mark

Gerstein, Erica Sodergren y George M. Weinstock.

**Resumen:** El gen 16S rRNA ha sido un pilar del análisis bacteriano basado en secuencias durante décadas. Sin embargo, la secuenciación de alto rendimiento del gen completo se ha convertido recientemente en una perspectiva realista. Aquí, utilizamos experimentos in silico y basados en secuencias para reevaluar críticamente el potencial del gen 16S para proporcionar resolución taxonómica a nivel de especie y cepa. Demostramos que la focalización de regiones variables 16S con plataformas de secuenciación de lectura corta no puede lograr la resolución taxonómica que ofrece la secuenciación de todo el gen (~1500 pb). Además, demostramos que las plataformas de secuenciación completa son lo suficientemente precisas como para resolver sustituciones sutiles de nucleótidos (pero no inserciones/deleciones) que existen entre las copias intragenómicas del gen 16S. En consecuencia, argumentamos que los enfoques de análisis modernos deben necesariamente tener en cuenta la variación intragenómica entre las copias del gen 16S. En particular, demostramos que el tratamiento adecuado de las variantes de copia intragenómica de 16S de longitud completa tiene el potencial de proporcionar una resolución taxonómica de las comunidades bacterianas a nivel de especie y cepa (9).

**url:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31695033/>

**Título:** Módulo de investigación del laboratorio de bioinformática en consultas: metagenómica. Estudio de microbios orales de estudiantes

**Autor:** Chrystal Ho Pao, Sou-Cheng T. Choi, Shu Yun Lok, Strom Dorrouugh, Connie Abelseth, Joyce Shelton, Angelo Rentasa.

**Resumen:** Las pautas curriculares, de la Sociedad Estadunidense de Microbiología resaltan la importancia de permitir a los estudiantes pensar críticamente y aprender investigando. Además, la información en biología, especialmente en genética y biotecnología, aumenta demasiado rápidamente como para que los instructores puedan enseñarlo todo. Para aumentar el interés y la comprensión de los estudiantes de importantes conceptos genéticos básicos y alentarlos a practicar la investigación científica, diseñamos un módulo de investigación para que los estudiantes de biología/ genética de nivel superior examinen las bacterias orales.

Los estudiantes extrajeron su propio ADN microbiano oral y lo amplificaron y analizaron con cebadores de PCR de ARNr 16S específicos de cada género y especie. Las muestras de ADN

microbiano también se amplificaron con cebadores de ARNr 16S de bacterias conservadas y los amplicones se clonaron con TOPO (clonación basada en topoisomerasa) y se secuenciaron con Sanger.

Por último, las muestras de ADN microbiano metagenómico también se secuenciaron mediante secuenciación de próxima generación de Illumina y se analizaron con herramientas bioinformáticas.

Hemos implementado el módulo en tres iteraciones de una clase de pregrado en una pequeña universidad de artes liberales. El proyecto culmina con una presentación de un póster que los estudiantes obtuvieron en promedio con un rango B alto. El análisis previo y posterior a la encuesta sobre los avances en el aprendizaje de los estudiantes reveló un aprendizaje significativo de los estudiantes ( $P < 0,05$  prueba clasificada con signos de Wilcoxon pareada y de una cola,  $n = 23$ ). A continuación, encuestamos las percepciones de los estudiantes sobre la actividad mediante una autoevaluación. Mucho más que la media, los estudiantes disfrutaron del módulo basado en la investigación y lo consideraron más eficaz para enseñar sobre PCR y otros conceptos de genética molecular que los tradicionales ejercicios de laboratorio prescritos.

Concluimos que este módulo de laboratorio de microbios induce interés en la investigación y es útil para enseñar conceptos genéticos importantes(15).

**url:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34594441/>

**Título:** Reducción de la bacteriemia tras el cepillado con un dentífrico triclosán/copolímero: estudio clínico aleatorizado.

**Autor:** Prem K Sreenivasan, Deborah Tischio – Bereski, Daniel H Fine.

**Resumen:** Los objetivos de este estudio eran: comprobar la susceptibilidad a la bacteriemia en sujetos con gingivitis moderada, y comparar los efectos del cepillado con un dentífrico con flúor (control) frente a un dentífrico con triclosán/copolímero (prueba) en los susceptibles a la bacteriemia repetida.

**Materiales y métodos:** Ciento siete sujetos adultos fueron sometidos a pruebas de bacteriemia repetida tras comer una manzana dura. Veintinueve sujetos positivos a la bacteriemia se inscribieron en un estudio cruzado doble ciego diseñado para analizar los efectos de un dentífrico de prueba. Tras la asignación aleatoria del dentífrico, los sujetos se cepillaron los dientes durante 21 días. Tras un periodo de lavado, los sujetos completaron el estudio con el dentífrico alternativo. El análisis estadístico comparó la bacteriemia entre los

grupos mediante un análisis de covarianza (ANCOVA).

**Resultados:** Veintiséis sujetos adultos completaron el estudio cruzado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la bacteriemia al inicio del estudio. Los recuentos bacterianos medios en las visitas iniciales y posteriores al tratamiento fueron de 45,5 y 10,8 recuentos frente a 48,5 y 38,0 recuentos, respectivamente (grupo de prueba frente a grupo de control; significativo en  $p < 0,05$ ). Se observaron reducciones significativas de las bacterias transmitidas por la sangre en los grupos de prueba frente a los de control, tanto en los datos culturales como en los de ADN ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** Un treinta por ciento de los sujetos mostraron bacteriemia repetida.

El cepillado con un dentífrico con triclosán/copolímero demostró reducciones significativas de la bacteriemia en comparación con el dentífrico de control (16).

**url:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28800147/>

**Título:** Efecto del dentífrico con triclosán en la contaminación del cepillo de dientes

**Autor:** Paulo Nelson- Filho, Alessandra Rigo Ispier, Sada Assed, Gisela Faria, Izabel Yokoyama

**Resumen:** El objetivo de este estudio fue evaluar mediante cultivo y microscopía electrónica de barrido (MEB) la contaminación de los cepillos de dientes de 30 niños (5-7 años) por estreptococos mutans (EM) cuando se utilizan dentífricos con o sin triclosán.

**Métodos:** Los procedimientos clínicos se dividieron en 3 fases con intervalos de 1 semana. En la fase 1 (grupo I), los niños se cepillaron los dientes sin dentífrico durante 4 minutos; la fase 2 (grupo II) se cepillaron con dentífrico fluorado (Tandy); la fase 3 (grupo III) se cepillaron con dentífrico que contenía triclosán (Colgate Total). A continuación, los cepillos dentales se sometieron a un proceso microbiológico para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de EM adheridas a las cerdas. Cuatro cepillos de dientes de cada grupo se analizaron mediante SEM.

**Resultados:** Los EM estaban presentes en el 93% de las cerdas de los cepillos dentales del grupo I y en el 77% de las cerdas de los cepillos dentales del grupo II.

Sólo el 40% de los cepillos del grupo III estaban contaminados con EM.

Cuando hubo un cultivo microbiológico positivo, se identificó por SEM la formación de biofilm bacteriano cariogénico adherido a las cerdas de todos los grupos.

**Conclusiones:** Las cerdas de los cepillos dentales estaban contaminadas por EM tras un solo uso. Un dentífrico que contenía triclosán redujo significativamente la contaminación

bacteriana de estos cepillos de dientes (17).

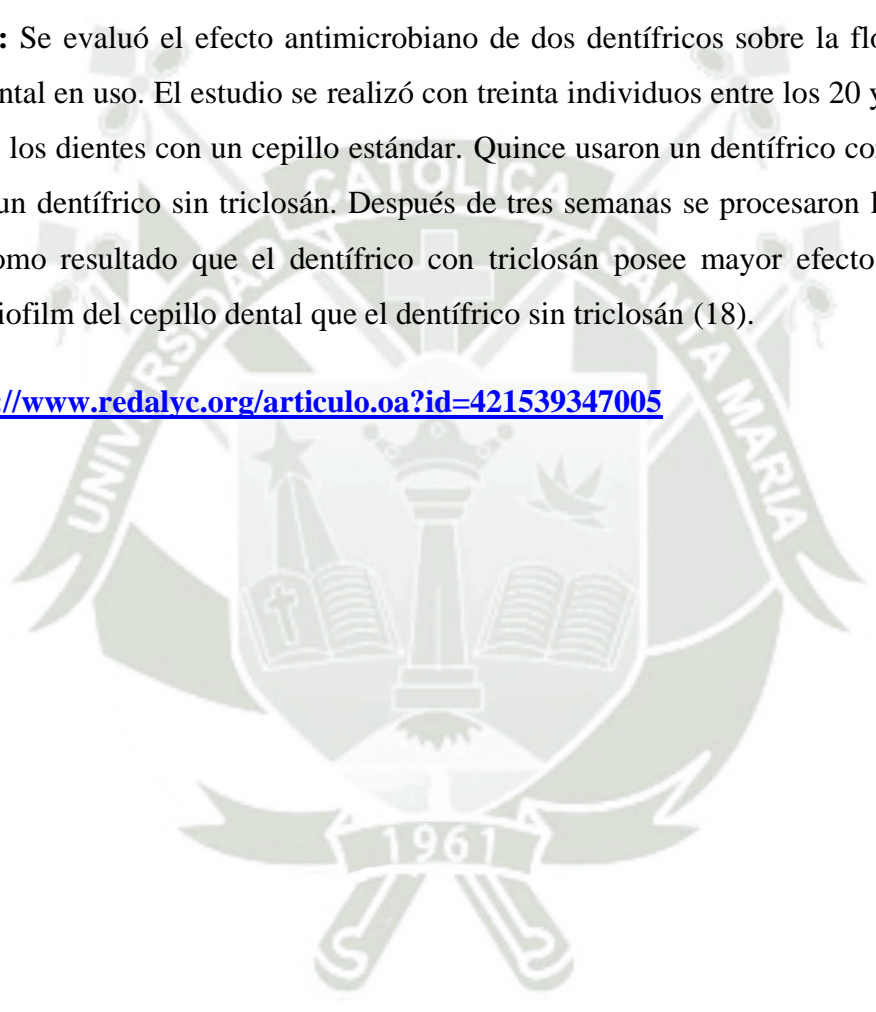
**url:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15080352/>

### 3.2.2. Antecedentes nacionales

**Título:** Efecto del Triclosán sobre el biofilm del cepillo dental Autor: Gustavo A. Obando, Karla E. Torres

**Resumen:** Se evaluó el efecto antimicrobiano de dos dentífricos sobre la flora aeróbica del cepillo dental en uso. El estudio se realizó con treinta individuos entre los 20 y 30 años que se cepillaron los dientes con un cepillo estándar. Quince usaron un dentífrico con triclosán y los restantes un dentífrico sin triclosán. Después de tres semanas se procesaron los cepillos y se obtuvo como resultado que el dentífrico con triclosán posee mayor efecto antimicrobiano sobre el biofilm del cepillo dental que el dentífrico sin triclosán (18).

**url:** <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421539347005>

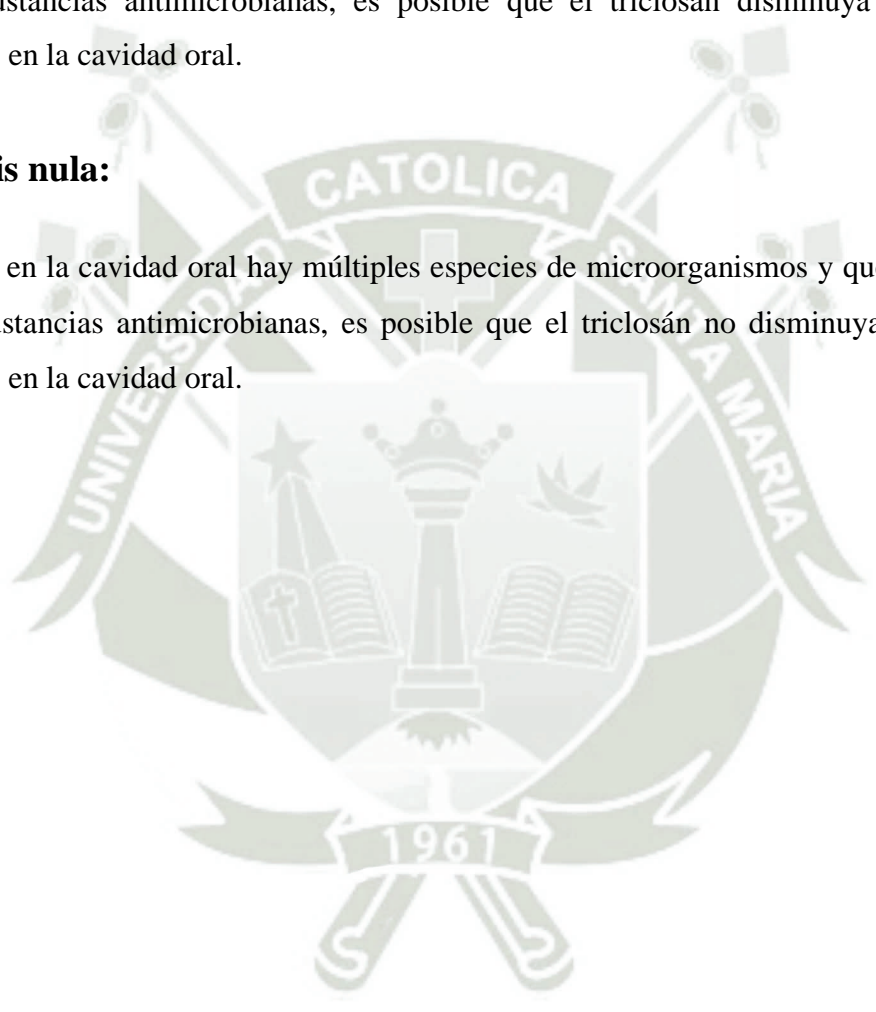


#### 4. Hipótesis:

Dado que en la cavidad oral hay múltiples especies de microorganismos y que los dentífricos poseen sustancias antimicrobianas, es posible que el triclosán disminuya la cantidad de microbios en la cavidad oral.

#### 5. Hipótesis nula:

Dado que en la cavidad oral hay múltiples especies de microorganismos y que los dentífricos poseen sustancias antimicrobianas, es posible que el triclosán no disminuya la cantidad de microbios en la cavidad oral.





## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

#### 1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

##### 1.1 Técnica

Se utilizará la técnica observación, experimental.

##### 1.1.1 Esquemmatización

VARIABLES	TÉCNICA	INSTRUMENTO
(INDEPENDIENTE) Microflora oral	Secuenciamiento 16S	Árbol filogenético
(DEPENDIENTE) Pasta Triclosán		

##### 1.1.2 Descripción de la técnica

La presente investigación busco determinar si existe algún impacto en la microflora oral antes y después del uso de triclosán por medio de muestras críticas. Se escogieron 5 alumnos estudiantes de la carrera de odontología con índice de CPOD bajo, de la Universidad Católica Santa María.

El primer paso fue la recolección de la saliva de los estudiantes, se les pidió a los sujetos que mastiquen papel Parafilm para el aumento de producción de saliva, de esa forma acumularon la saliva en la cavidad oral durante ciertos periodos de tiempo para luego depositarlo en un tubo de recolección estéril de 50ml para recoger un volumen de 15ml, posteriormente fueron refrigerados inmediatamente después de la recolección y almacenados hasta el momento de la recaudación con la ayuda del extractor 16S RNA, se realizó el mismo procedimiento con la

diferencia de una semana, en ese tiempo los estudiantes utilizaron pasta con triclosán que se les fue dada y seguido se procedió a hacer el mismo método para la recolección de saliva.

Los estudiantes de 5to año recibieron un cepillo dental simple en cada fase.

Después de las dos semanas de recolección, se empezó el proceso de descongelamiento para la extracción del material genético conforme el kit del fabricante.

Una vez extraído el material genético se procedió a cuantificar para ser enviado a su análisis de amplificación y secuenciamiento (macrogen NY.USA)

Posteriormente las muestras fueron analizadas y los resultados fueron enviados en formato HTML y las secuencias individuales fueron registradas para el procesamiento futuro del Software DNASTAR.

## **1.2. Instrumento**

Para la siguiente investigación se utilizó el programa DNASTAR 17.3 (Wisconsin USA).

### **1.2.1 Precisión del instrumento**

La técnica 16S es una técnica molecular muy precisa y por consiguiente costosa, y es por eso que el tamaño mínimo para esta técnica es de 5 muestras aleatorias (19). El DNASTAR es un programa de bioinformática donde se realizan alineamientos para especificar el árbol filogenético de las especies a estudiar.

El tamaño de la muestra se limitó a 5 alumnos, esto teniendo en cuenta el debido procedimiento en cada muestra es laborioso y demanda de tiempo para ver los resultados y tomar nuevas muestras. Además; teniendo un tamaño de muestra de 5 alumnos podemos aprovechar este tiempo en priorizar a la calidad y profundidad en el análisis de cada una de las muestras, asegurando que cada uno de los datos obtenidos estuviera cerca de la excelencia y permitan sacar conclusiones validas sin comprometer la rigurosidad científica.

### **1.2.2 Estructura**

El programa DNASTAR tiene diferentes subprogramas, en esta oportunidad se utilizó MegAlign.

## **2. CAMPO DE VERIFICACIÓN**

### **2.1. Ubicación espacial**

#### **2.1.1. Ámbito general**

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el ámbito general de la ciudad de Arequipa.

#### **2.1.2. Ámbito Específico**

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio química de proteínas (núcleo de inmuno informática) de la Universidad Católica de Santa María.

### **2.2 Ubicación temporal**

La investigación previamente mencionada se llevó a cabo en los meses de Marzo hasta Agosto.

### **2.3 Unidades de estudio**

Se tomaron muestras de 5 personas por fase siendo estas las mismas personas con diferencia de una semana.

#### **A. Criterios de Inclusión:**

- Estudiantes de X semestre con matrícula regular que estén cursando clínica de odontología en la Universidad Católica Santa María.
- Tener disposición de formar parte del estudio.
- Tener las 28 piezas dentales con índice bajo de CPOD.

**B. Criterios de Exclusión:**

- No ser estudiante regular de la carrera de Odontología.
- No estar dispuesto a participar en el estudio.
- Que presenten prótesis parciales o removibles.
- Tener un índice medio – alto de CPOD.

**C. Población:**

La presente investigación se realizó con el total de la población que cuenta con los criterios previamente mencionados; siendo en este caso una población de 5 estudiantes de la Universidad Católica Santa María.

**D. Consideraciones éticas:**

- El actual proyecto de investigación fue presentado al Comité de Ética Institucional de la Universidad Católica de Santa María, para la obtención de su aprobación.
- La totalidad de estudiantes que formaron parte del estudio completaron un formato de consentimiento informado previo a su participación en el mismo.

### 3 RECURSOS

#### 3.1 Recursos humanos

- **Investigadora** : Yara Luciana Bejarano Andia
- **Asesor** : Luis Alberto Ponce Soto

#### 3.2 Recursos virtuales

- Laptop HP.
- Excel
- Word
- DNASTAR

#### 3.3 Recursos Físicos

- Artículos científicos.
- Útiles de escritorio.
- Computadora, laptop, cámaras.

### 3.4 Recursos económicos

La ejecución del proyecto será autofinanciada por el autor.

### 3.5 Recursos institucionales

Universidad Católica Santa María.



## 4 ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

### 4.1 Tipo de procesamiento

Manual y Computarizado (programa DNASTAR versión 17.3).

### 4.2 Operaciones del procesamiento

#### b.1. Clasificación

La información obtenida será ordenada en una base de datos correspondiente al Programa EditSeq.

#### b.2. Codificación

Digital.

#### b.3. Conteo o puntualización

Empleando matrices de conteo los datos se contabilizaron digitalmente en forma de árbol filogenético.

#### b.4. Graficación

Árbol Filogenético.

### 4.3 Plan de análisis de datos

#### Tipo de análisis

El análisis será estadístico descriptivo correlacional empleando el programa DNASTAR.



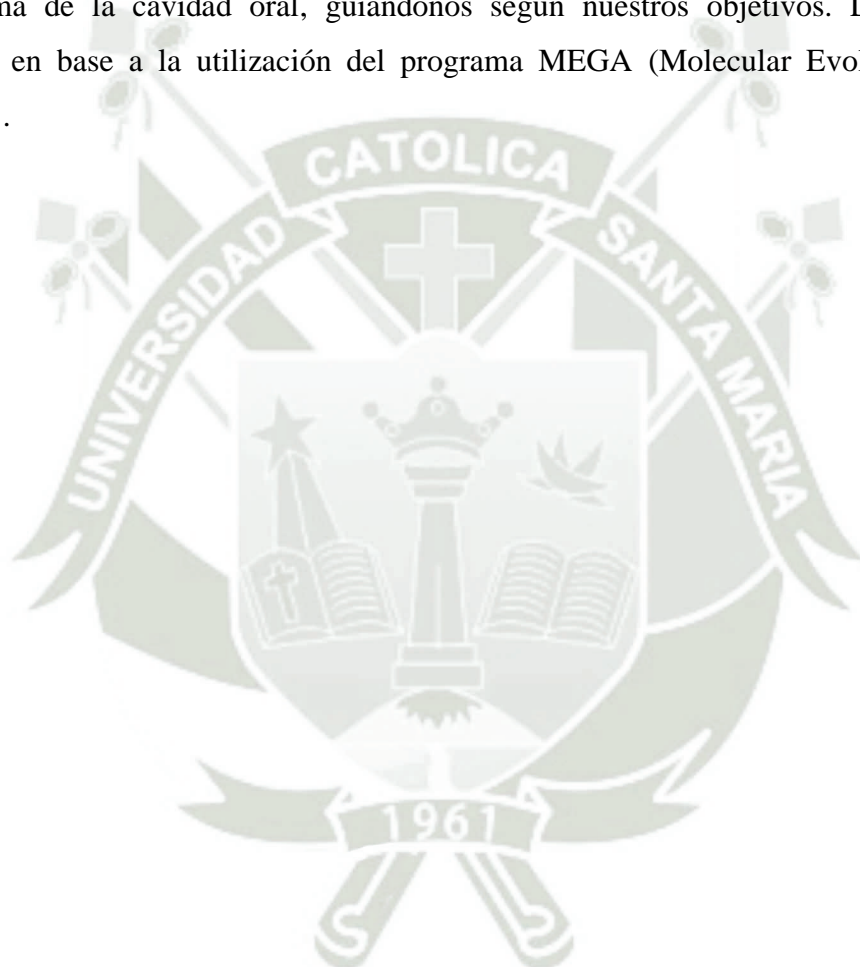
# **CAPÍTULO III**

## **RESULTADOS**

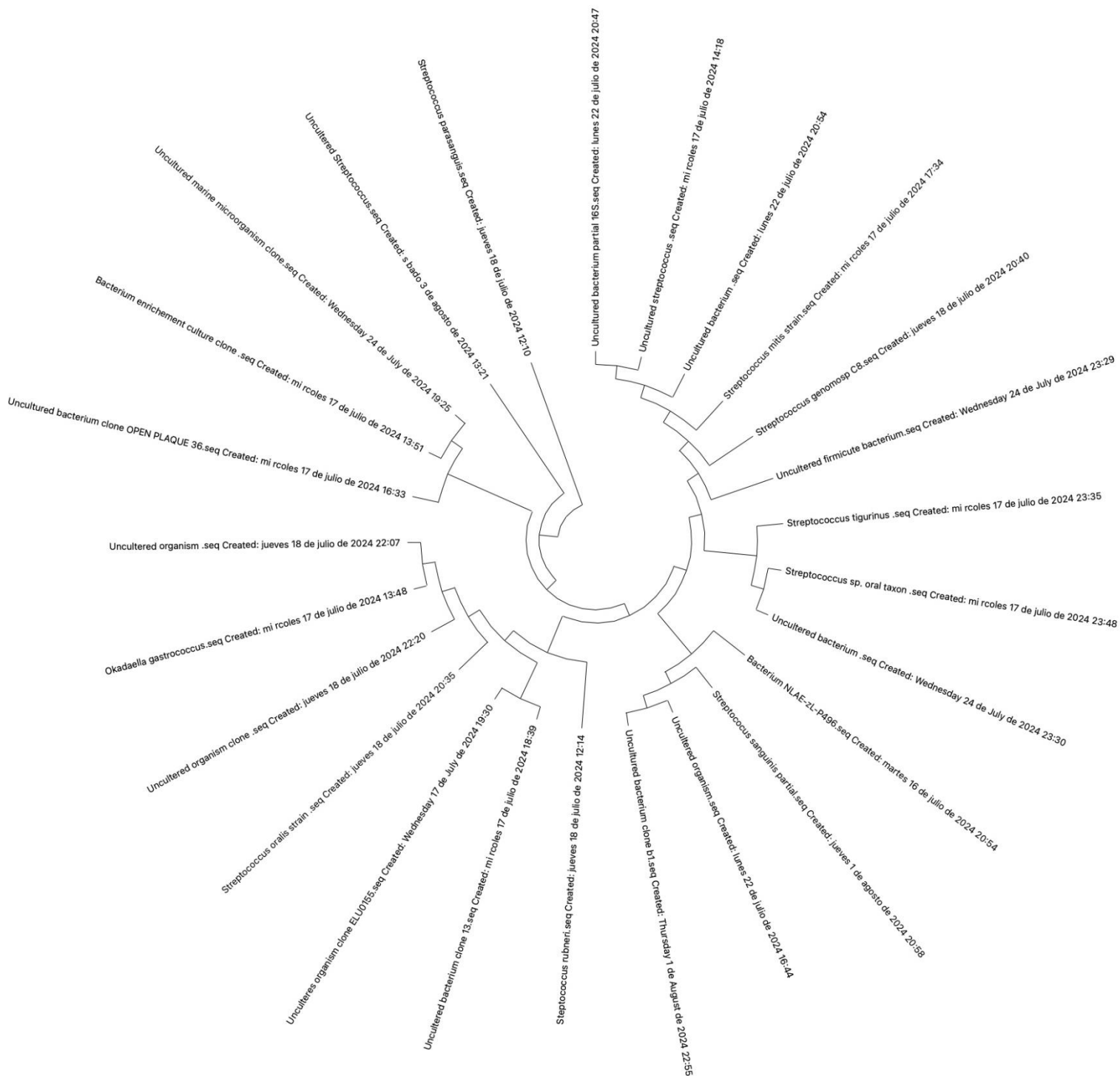
### CAPÍTULO III

#### RESULTADOS

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en base a las muestras recolectadas del microbioma de la cavidad oral, guiándonos según nuestros objetivos. Los datos fueron obtenidos en base a la utilización del programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) .



**GRÁFICO 1**  
**ARBOL FILOGENETICO MUESTRA I**

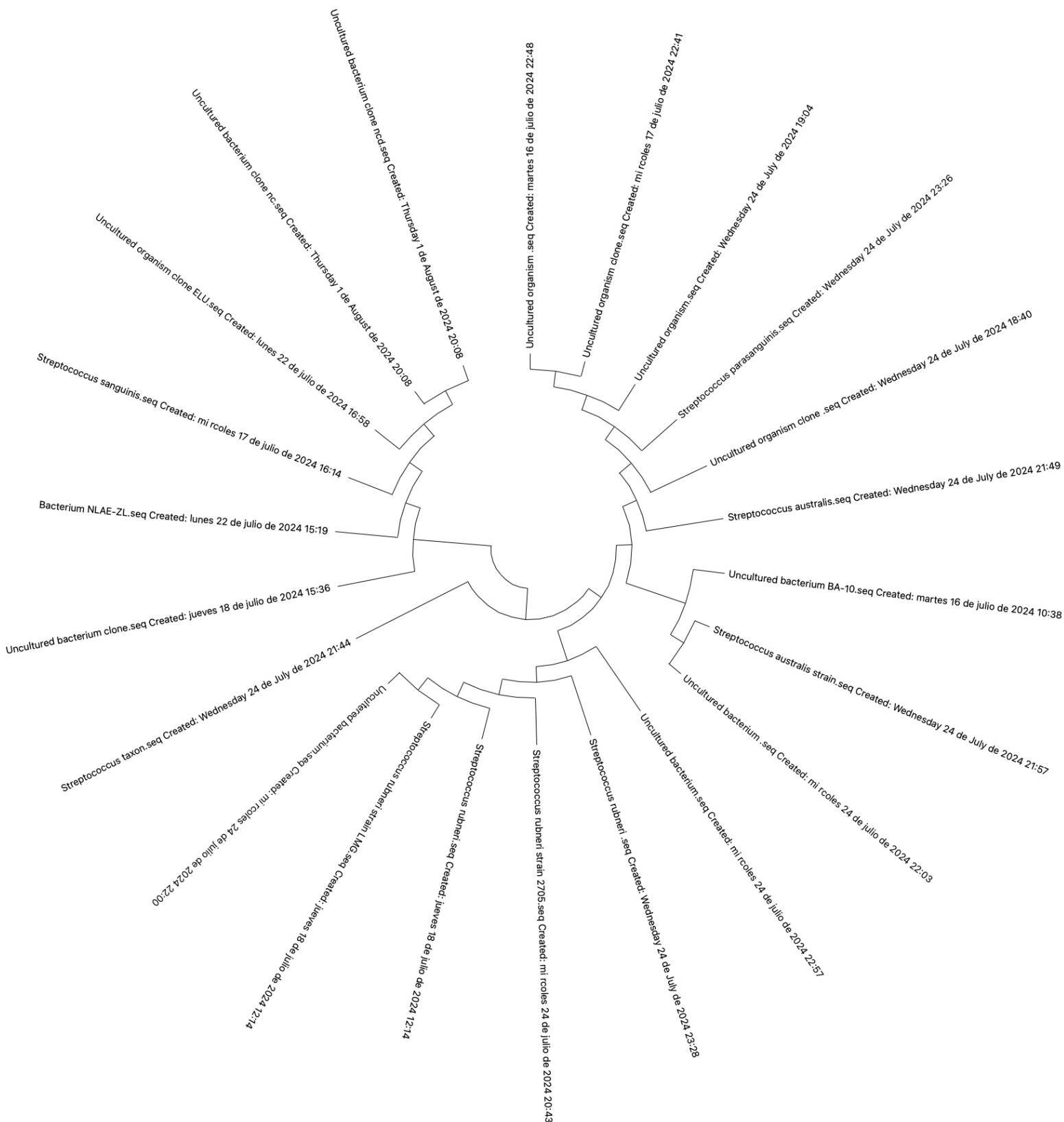


**INTERPRETACIÓN:** En el grafico 1 se observan 25 muestras bacterianas: *Streptococcus parasanguis*, *Uncultured Streptococcus*, *Uncultured marine microorganism*, *Bacterium enrichment culture*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured organism*, *Okadaella gastrococcus*, *Uncultured organism clone*, *Streptococcus oralis strain*, *Uncultured organism clone*, *Uncultured bacterium clone*, *Streptococcus Rubneri*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured organism*, *Streptococcus sanguinis*, *Bacterium NLAE*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus sp.*, *Streptococcus tigurinus*, *Uncultured firmicute bacterium*, *Streptococcus genomosp*, *Streptococcus mitis*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured bacterium*.

**Siendo las más relevantes:** *Uncultured marine microorganism*, *Okadaella gastrococcus*, *Streptococcus Rubneri*, *Streptococcus tigurinus*, *Bacterium enrichment culture*, *Bacterium NLAE*, *Streptococcus genomosp*.

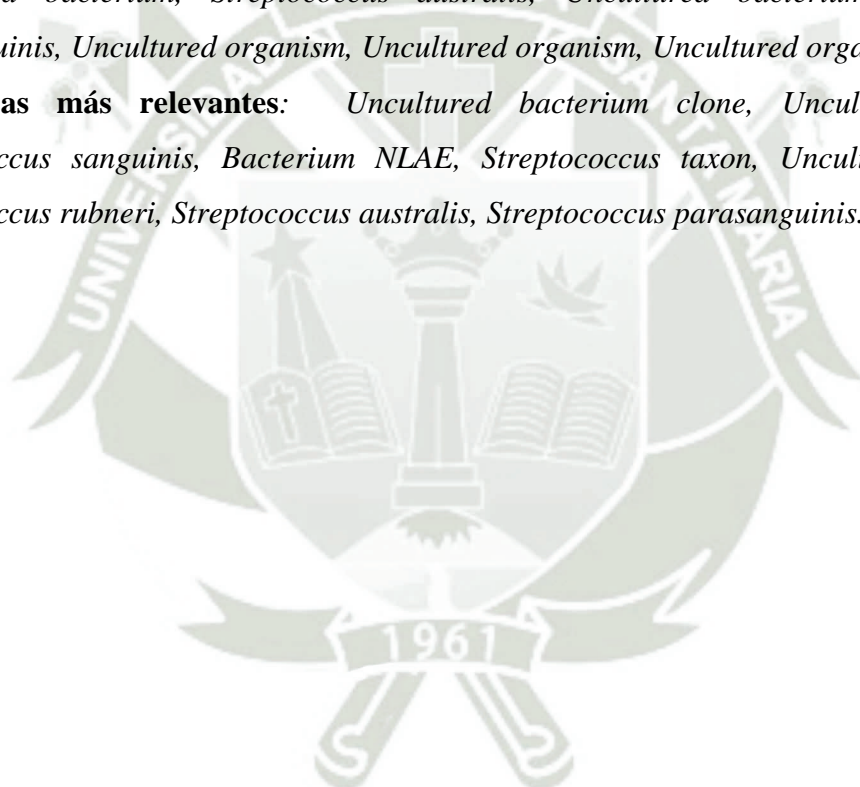


## GRÁFICO 2 ARBOL FILOGENETICO MUESTRA II

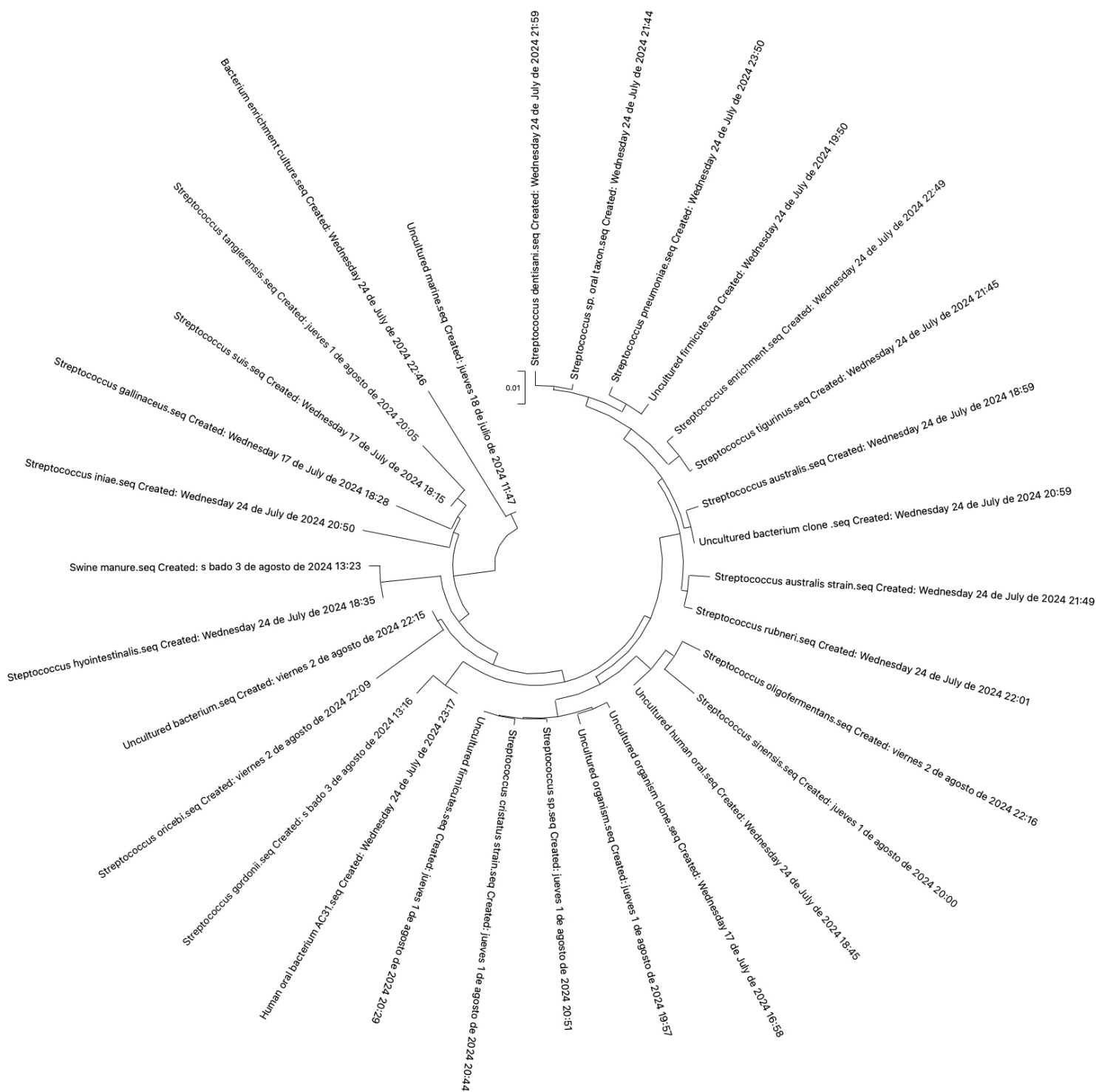


**INTERPRETACIÓN:** En el grafico dos se observan 22 muestras bacterianas: *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured organism clone*, *Streptococcus sanguinis*, *Bacterium NLAE*, *Uncultured bacterium clone*, *Streptococcus taxon*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus rubneri*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus australis*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus australis*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus parasanguinis*, *Uncultured organism*, *Uncultured organism*, *Uncultured organism*.

**Siendo las más relevantes:** *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured organism*, *Streptococcus sanguinis*, *Bacterium NLAE*, *Streptococcus taxon*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus parasanguinis*.



**GRAFICO 3**  
**ARBOL FILOGENETICO MUESTRA III**

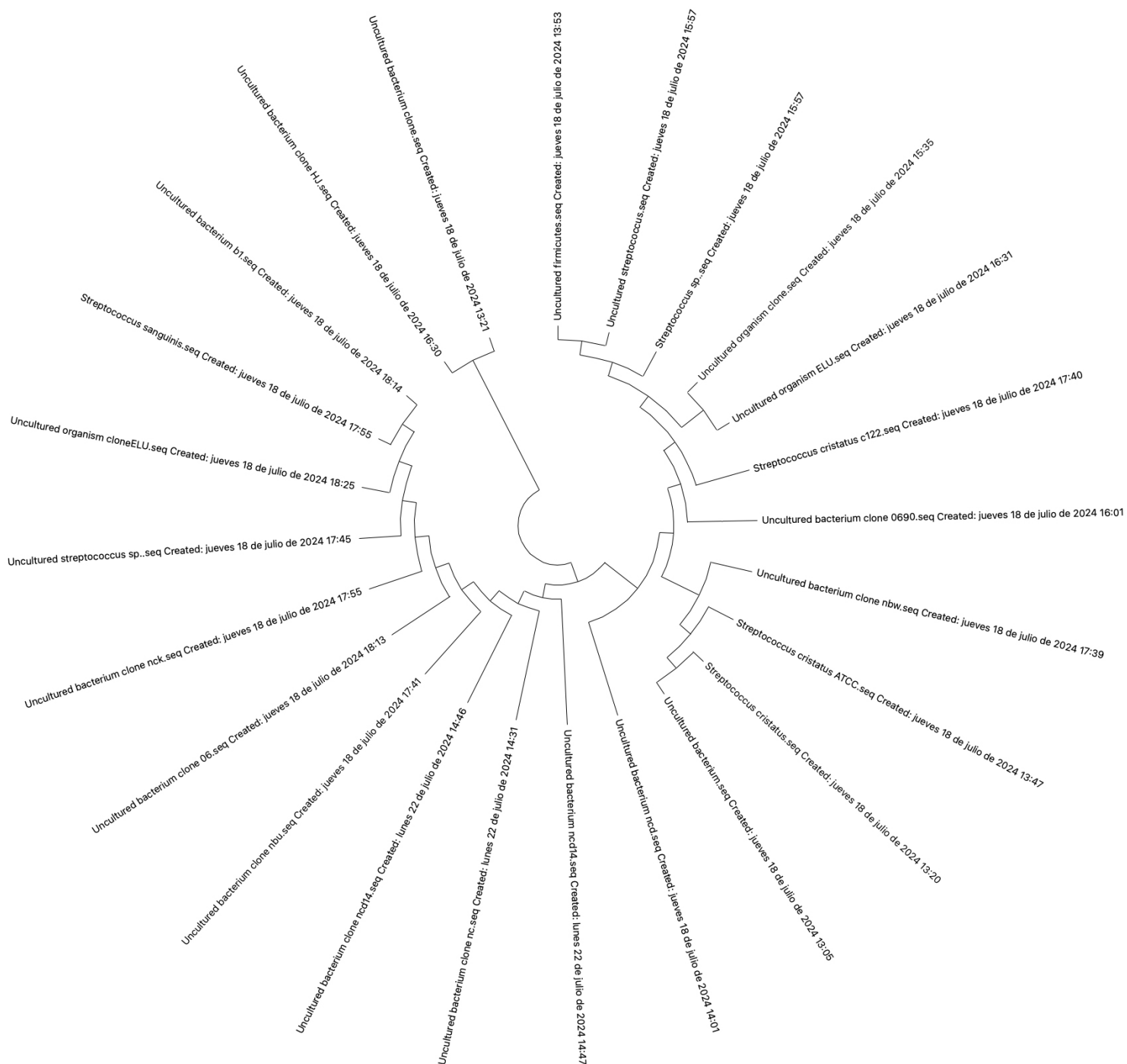


**INTERPRETACIÓN:** En el gráfico tres se observan 30 muestras bacterianas: *Uncultured marine*, *Bacterium enrichment culture*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus iniae*, *Swine manure*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus gordinii*, *Human oral bacterium AC31*, *Uncultured firmicutes*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sp*, *Uncultured organism*, *Uncultured organism clone*, *Uncultured human oral*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus australis*, *Uncultured bacterium clone*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus enrichment*, *Uncultured firmicute*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sp. Oral taxon*, *Streptococcus dentisani*.

**Siendo las más relevantes:** *Uncultured marine*, *Bacterium enrichment culture*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus iniae*, *Swine manure*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus gordinii*, *Human oral bacterium AC31*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus pneumoniae*.

### GRAFICO 4

### ARBOL FILOGENETICO MUESTRA IV



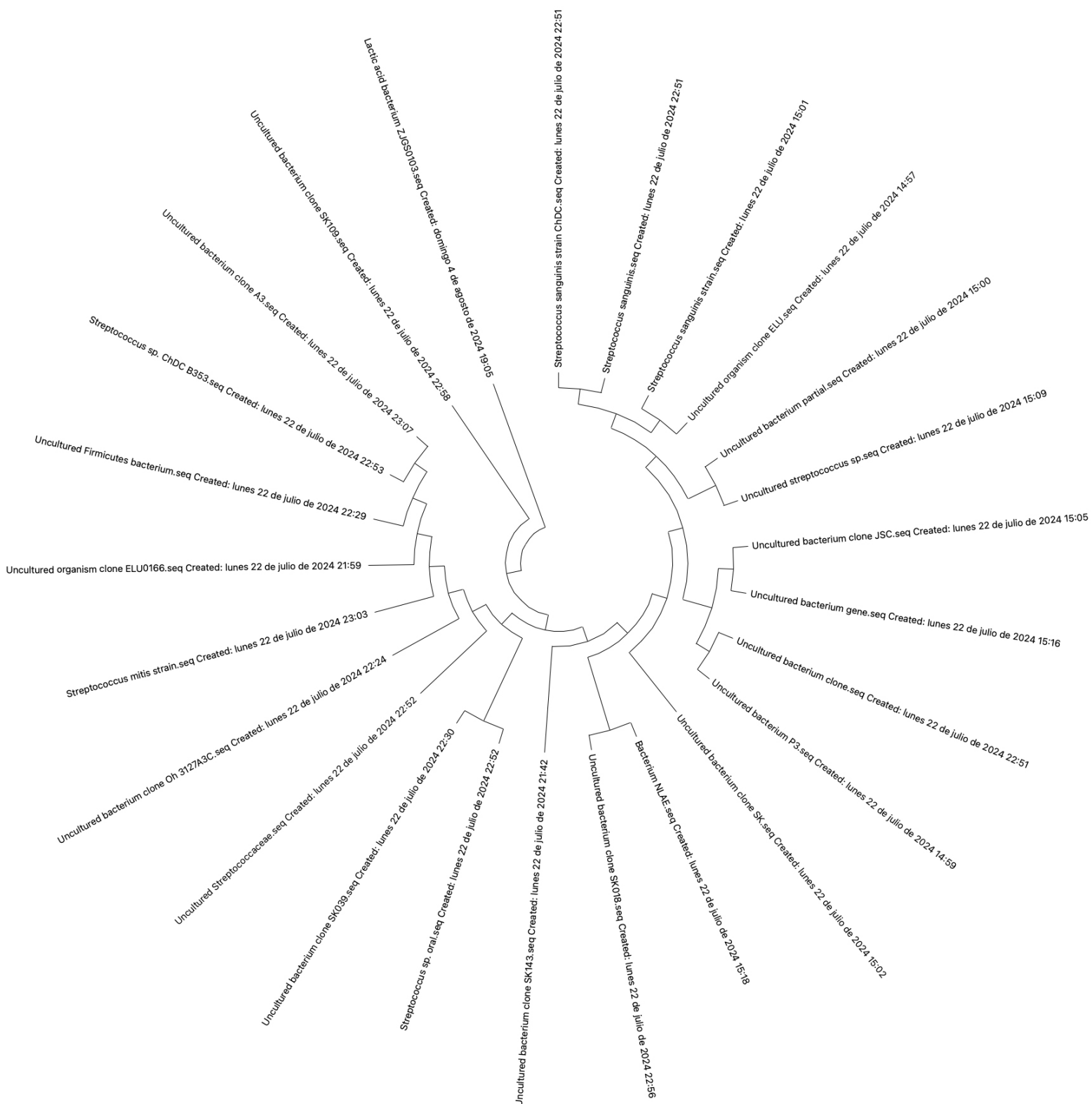
**INTERPTRETACIÓN:** En el grafico cuatro se observan 24 muestras bacterianas: *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus sanguinis*, *Uncultured organism*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium clone*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus cristatus*, *Uncultured organism*, *Uncultured organism*, *Streptococcus sp*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured firmicutes*.

**Siendo las más relevantes:** *Streptococcus cristatus*, *Uncultured firmicutes*



## GRAFICO 5

### ARBOL FILOGENETICO MUESTRA V



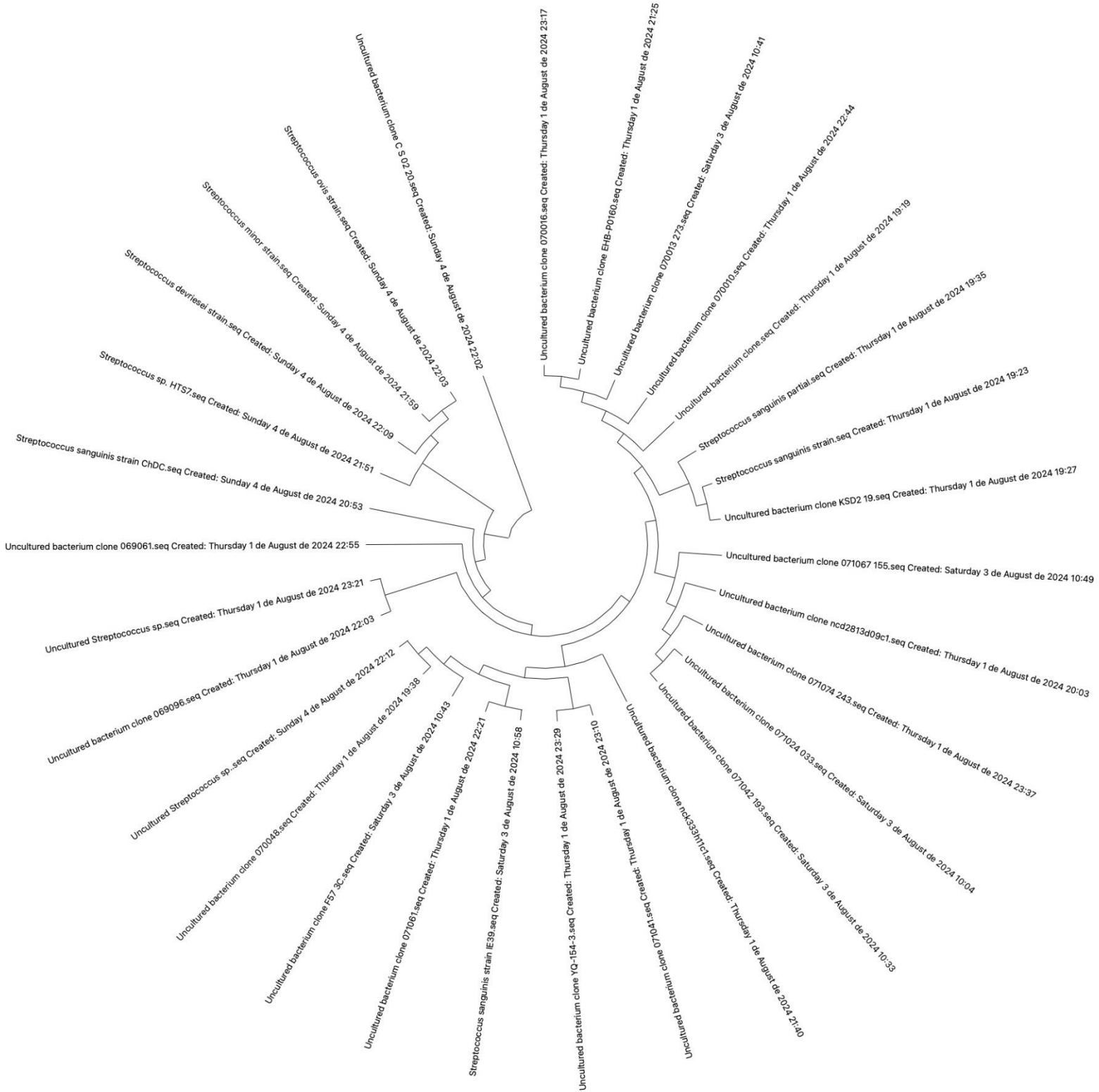
**INTERPRETACIÓN:** En el grafico cinco se observan 25 muestras bacterianas: *Lactic acid bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus sp.*, *Uncultured firmicutes*, *Uncultured organism*, *Streptococcus mitis*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured streptococcaceae*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus sp.*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Bacterium NLAE*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured organism*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sanguinis*

**Siendo las más relevantes:** *Uncultured firmicutes*, *Streptococcus mitis*, *Uncultured streptococcaceae*, *Bacterium NLAE*.



### GRAFICO 6

### ARBOL FILOGENETICO MUESTRA VI



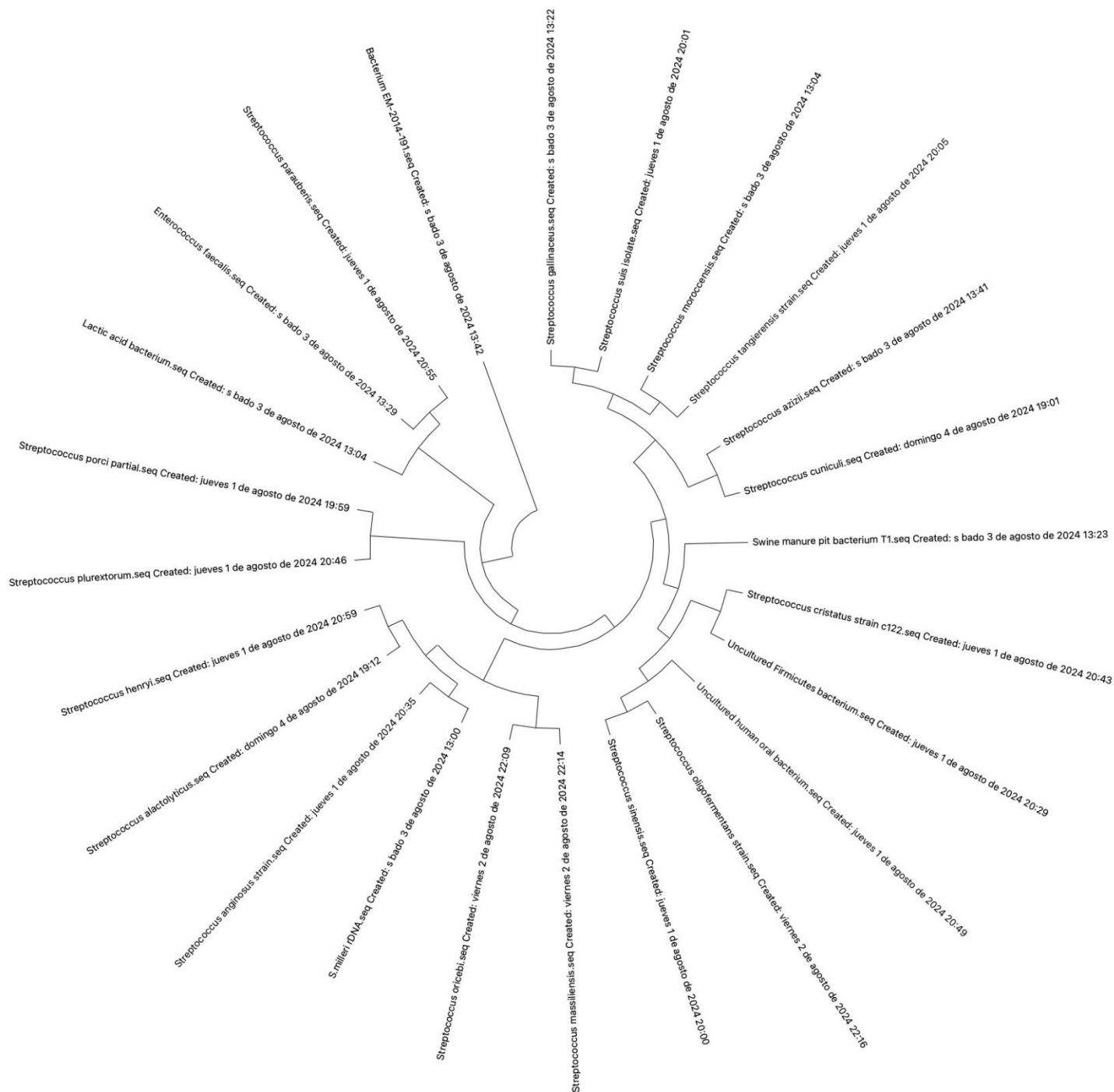
**INTERPRETACIÓN:** En el grafico doce se observan 30 muestras bacterianas: *Uncultured bacterium*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus devriesei*, *Streptococcus sp.*, *Streptococcus sanguinis*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus sanguinis*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sanguinis*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*.

**Siendo las más relevantes:** *Streptococcus ovis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus devriesei*, *Streptococcus sp.*



## GRAFICO 7

### ARBOL FILOGENETICO MUESTRA VII

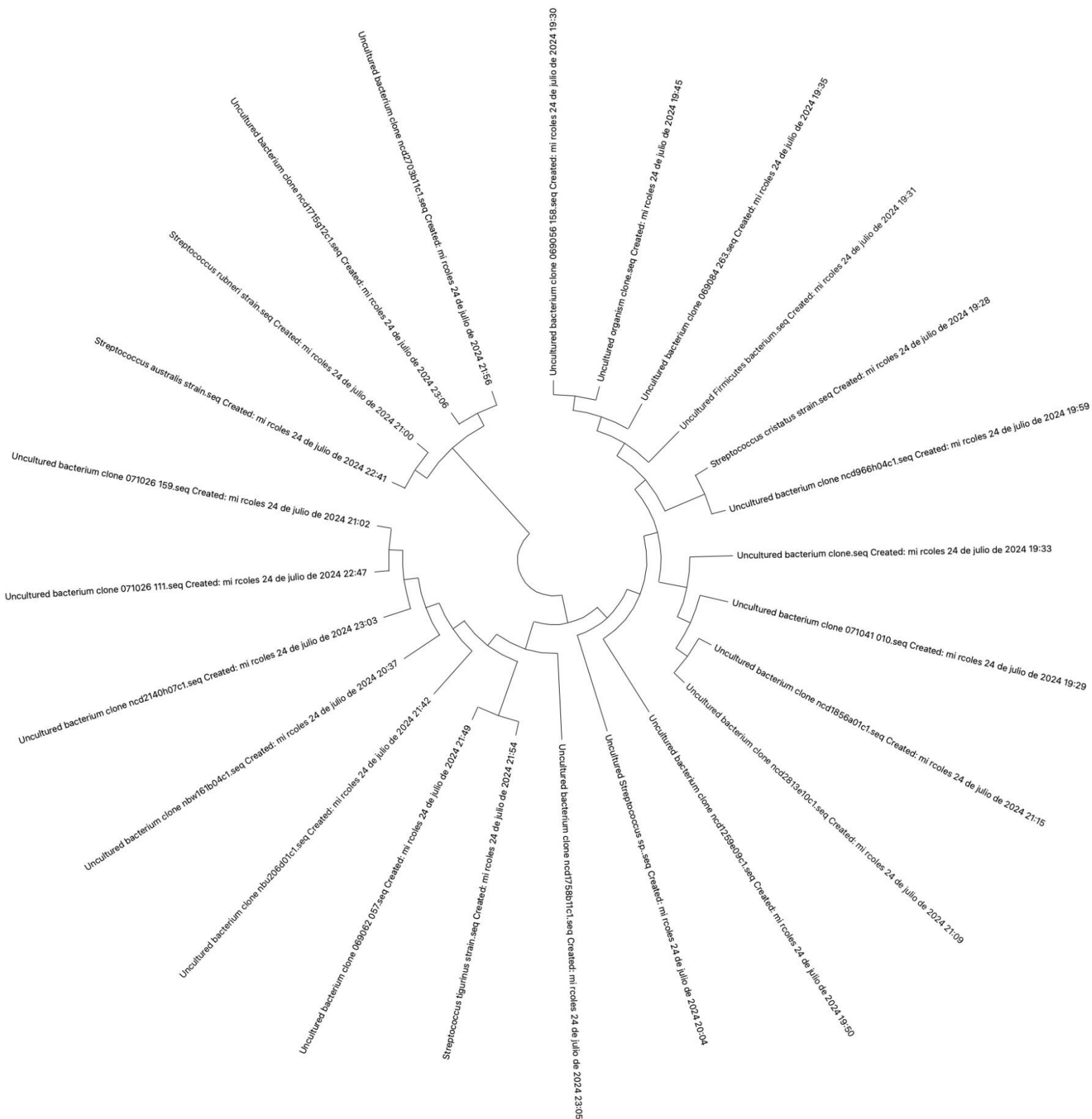


**INTERPRETACIÓN:** En el grafico siete se observan 24 muestras bacterianas: *Bacterium EM*, *Streptococcus parauberis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactic acid bacterium*, *Streptococcus porci*, *Streptococcus plurextorum*, *Streptococcus henryi*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *S.millleri*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Uncultured human oral*, *Uncultured firmicutes bacterium*, *Streptococcus cristatus*, *Swine manure*, *Streptococcus cuniculi*, *Streptococcus azizii*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus moroccensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*.

**Siendo las más relevantes:** *Streptococcus parauberis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus porci*, *Streptococcus plurextorum*, *Streptococcus henryi*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *S.millleri*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus cristatus*, *Swine manure*, *Streptococcus cuniculi*, *Streptococcus azizii*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus moroccensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*.

## GRAFICO 8

### ARBOL FILOGENETICO MUESTRA VIII



**INTERPRETACIÓN:** En el grafico ocho se observan 24 muestras bacterianas: *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus australis*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus tigurinus*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured streptococcus*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured bacterium*, *Streptococcus cristatus*, *Uncultured firmicute*, *Uncultured bacterium*, *Uncultured organism*, *Uncultured bacterium*.

**Siendo las más relevantes:** *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus cristatus*.



## DISCUSIÓN

El microbioma oral está formado por diversas especies de microorganismos, esencialmente bacterias del género *Streptococcus*, importantes para el bienestar de la cavidad oral y primeros colonizadores, lo cuales van a permitir la coagracación de otros tipos de bacterias. Se calcula que existe más de 700 especies diferentes de bacterias alojadas en la cavidad oral, cultivadas y no cultivadas, lo que lo identifica como uno de los biomas más diversos del cuerpo humano. Un factor importante en la composición y la actividad del microbioma oral es la saliva (20), ya que es el medio donde las bacterias en su forma planctónica (no adherida) permanecen hasta colonizar nuevos sitios.

En nuestras muestras procesadas en pacientes normales, utilizando secuenciamiento 16S, fueron identificados diversas bacterias que conforman el microbioma oral de la saliva según datos previamente reportados, los cuales fueron: *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus gordonii*; estos datos están de acuerdo con los datos obtenidos por la literatura(21), (22), (23), (24), (25), (26), (27),(28).

Según los protocolos utilizados en la presente investigación, hemos encontrado además, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus devriesei*, *Streptococcus Anginosus*, perteneciendo a la familia de *Streptococcus* según los autores (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35), (36), este dato es importante recalcar porque se demuestra que la familia de los *Streptococcus* es la que más abunda en saliva por lo que se podría deducir que estos son los colonizadores por excelencia (37).

Se encontraron también bacterias poco comunes como *Uncultured marine microorganism*, *Streptococcus tigurinus*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus Anginosus*, *Okadaella gastrococcus*, estas bacterias, aunque son infrecuentes se han podido identificar en microbiomas orales, por ejemplo:

*Uncultured marine microorganism* según Wang (38) nos explica que la gran cantidad de microorganismos marinos no han sido cultivados en condiciones de laboratorio y se consideran “materia oscura microbiana” (38), la presencia de microorganismos marinos en la cavidad oral del ser humano puede ser el resultado de la ingesta de alimentos que luego puedan colonizar temporalmente en su boca, ya que los microorganismos marinos están vinculados a la vida humana gracias a las influencias microbianas en las redes alimentarias

oceánicas (39).

Otra de las bacterias encontradas es el *Streptococcus tigurinus*, según María Ercibengoa (40), fue definido recientemente como una nueva especie estreptocócica dentro del grupo de los *Streptococcus viridans* (40). Según la autora Zbinden (41), El *Streptococcus tigurinus* pertenece al grupo de *Streptococcus mitis*, certificando su presencia en la cavidad oral humana (41). Los datos encontrados en nuestra presente investigación corroboran con los hallazgos de los presentes investigadores.

De igual forma se encontraron *Streptococcus* no cultivados (*Uncultured streptococcus*) pertenecientes a la familia de *Streptococcus*, este término hace referencia a las especies bacterianas del género *Streptococcus* que no pueden ser cultivadas con métodos tradicionales de cultivo en el laboratorio, puede generarse por la necesidad de condiciones específicas de crecimiento que no se puede realizar en medios de cultivo estándar o porque son parte de comunidades microbianas complejas que necesitan interacción con otros microorganismos para poder desarrollarse (42).

Continuando con el *Streptococcus massiliensis*, es una especie de bacteria de la familia de *Streptococcus Viridians* que son conocidos por formar parte del microbiota normal en humanos ubicados en la cavidad oral y el tracto respiratorio superior, este fue identificado como un nuevo taxón a partir de un aislamiento realizado en un cultivo de sangre de un paciente (43).

Sin embargo, también se sugirió que podría ser parte del microbiota oral según Pontigo (44), donde nos explica que el *Streptococcus* es un linaje bacteriano diverso y que la cavidad oral surgió como un entorno potencial, esta suposición basándose en la filogenia se pudo confirmar a través de la amplificación PCR (44).

Seguido tenemos al *Streptococcus milleri*, es un término que se refiere a un grupo de bacterias que incluyen tres especies principales: *Streptococcus Anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius* (45). Este se encuentra comúnmente en el microbiota normal de la cavidad oral y están presentes en mayor número en los dientes que en otras partes de la boca según el Mejáre (46). En nuestras muestras obtenidas el único *Streptococcus* de este grupo de especies encontramos al *Streptococcus Anginosus* (SAG).

Se encontró en dos de las muestras *Streptococcus Enrichment* en donde se pudo encontrar posibles referencias relacionadas a la cocaína (47), esto no sugiere que los individuos de los cuales hemos obtenido muestras tengan que ser consumidores de cocaína si no que puedan haber obtenido este microorganismo por otros vectores.

Por último, se encontraron en nuestras muestras bacterias que no conforman el microbioma oral: *Okadaella gastrococcus* y *Streptococcus genomosp*, *Uncultured streptococaceae*, siendo en este trabajo el primero en hacerlo y relacionándolo con la cavidad oral.

En este presente trabajo también se encontraron microorganismos presentes en animales como el *Streptococcus minor* el cual está relacionado directamente con los canes y se reportado en un artículo de la literatura que este microorganismo pasa de perro a dueño (48).

Además, en el presente estudio se han podido observar especies de bacterias que no tienen relación con el microbioma oral humano en la literatura, siendo el presente trabajo el primero que los reporta las cuales son: *Streptococcus tangierensis* proveniente de cabras, *Streptococcus suis* proveniente de cerdos, *Streptococcus gallinaceus* proveniente de gallinas, *Streptococcus iniae* proveniente de peces, *swine manure* proveniente de estiércol porcino, *Streptococcus hyointestinalis* proveniente de los pollos, *Streptococcus ovis* proveniente de cabras, *Streptococcus parauberis* proveniente de la vaca, *Streptococcus porci* proveniente del cerdo, *Streptococcus plurextorum* proveniente del cerdo, *Streptococcus henryi* proveniente de los caballos, *Streptococcus alactolyticus* proveniente de animales, *Streptococcus cuniculli* proveniente de conejos, *Streptococcus azizii* proveniente de ratones, *Streptococcus moroccensis* proveniente de cabras.

El microbioma oral es un componente vital para la salud general del cuerpo humano, con todos estos resultados podemos determinar que en un microbioma oral no necesariamente está compuesto solo por bacterias específicas de la boca, sino también por bacterias poco frecuentes y hasta bacterias nuevas que se adaptan al ambiente de la cavidad oral.

## CONCLUSIONES

1. Las bacterias encontradas en el microbioma oral normal son: *Streptococcus parasanguinis*, *Okadaella gastrococcus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus genomosp*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus iniae*, *Swine manure*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus pneumoniae*.
2. Las bacterias encontradas en el microbioma oral después del uso de la pasta con triclosán son: *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus mitis*, *Uncultured streptococcus*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Swine manure*, *Streptococcus oricebi*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus devriesei*, *Streptococcus parauberis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus porci*, *Streptococcus plurextorum*, *Streptococcus Henryi*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus Anginosus*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus cuniculli*, *Streptococcus azizii*, *Streptococcus moroccensis*.
3. La pasta triclosán baja el número de bacterias, pero no las elimina.
4. Se encontraron bacterias no relacionadas a la cavidad oral: *Streptococcus minor*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus cuniculli*, *Streptococcus azizii*, *Streptococcus tangierensis*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus moroccensis*, *Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus porci*, *Streptococcus plurextorum*, *Streptococcus iniae*, *Swine manure*, *Streptococcus henryi*, *Streptococcus alactolyticus*.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios de microbiomas orales de las diferentes lesiones bucales, utilizando la tecnología 16S.
2. Motivar a la investigación en esta área, empleando diversos tipos de tratamiento y ver si el microbioma varío.
3. Inculcar nuevas bacterias dentro de la rama de microbiología.
4. Se recomienda ampliar el área de investigación en odontología.



## REFERENCIAS

1. Blaustein RA, Michelitsch LM, Glawe AJ, Lee H, Huttelmaier S, Hellgeth N, et al. Toothbrush microbiomes feature a meeting ground for human oral and environmental microbiota. *Microbiome*. 2021;9(1):32.
2. Moya AS. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*. 2017;30:305-11.
3. Liu YX, Qin Y, Chen T, Lu M, Qian X, Guo X, et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein Cell*. 2021;12(5):315-30.
4. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):122-8.
5. Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):120.
6. Sujatha Govindarajan VPV, Theerthika Dillibabu, Shankargouda Patil Cavidad bucal: una fuente resistente para el muestreo de ADN. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2022;23:1-2.
7. Perea EJ. [Oral microbiology in the era of genomics and proteomics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23(3):113-5.
8. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):840-62, table of contents.
9. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*. 2019;10(1):5029.
10. Rodicio Mdel R, Mendoza Mdel C. [Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(4):238-45.
11. Akalin PK. Introduction to bioinformatics. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(7):610-9.
12. Lippert F. An introduction to toothpaste - its purpose, history and ingredients. *Monogr Oral Sci*. 2013;23:1-14.

13. Unterbrink P, Schulze Zur Wiesche E, Meyer F, Fandrich P, Amaechi BT, Enax J. Prevention of Dental Caries: A Review on the Improvements of Toothpaste Formulations from 1900 to 2023. *Dent J (Basel)*. 2024;12(3).
14. Carda-Dieguez M, Moazzez R, Mira A. Functional changes in the oral microbiome after use of fluoride and arginine containing dentifrices: a metagenomic and metatranscriptomic study. *Microbiome*. 2022;10(1):159.
15. Ho Pao C, Choi ST, Lok SY, Dorrough S, Abelseth C, Shelton J, et al. Inquiry-Driven Bioinformatics Laboratory Research Module: Metagenomic Study of Student Oral Microbes. *J Microbiol Biol Educ*. 2021;22(2).
16. Sreenivasan PK, Tischio-Bereski D, Fine DH. Reduction in bacteremia after brushing with a triclosan/copolymer dentifrice-A randomized clinical study. *J Clin Periodontol*. 2017;44(10):1020-8.
17. Nelson-Filho P, Ispier AR, Assed S, Faria G, Ito IY. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. *Pediatr Dent*. 2004;26(1):11-6.
18. Gustavo A. Obando KET. Efecto del Triclosán sobre biofilm del cepillo dental. *Revista Estomatológica Herediana*. 2007;17 25-8.
19. Schierwagen R, Alvarez-Silva C, Madsen MSA, Kolbe CC, Meyer C, Thomas D, et al. Circulating microbiome in blood of different circulatory compartments. *Gut*. 2019;68(3):578-80.
20. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):80-92.
21. M Gobbetti and M Calasso. *STREPTOCOCCUS*. Elsevier Ltd. 2014;3:535-53.
22. Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. Streptococcus sanguinis biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol*. 2018;13(8):915-32.
23. Cruz Cardoso J, Ferreira D, Assis R, Monteiro J, Coelho I, Real A, et al. Streptococcus oralis Meningitis. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2021;8(5):002349.
24. Willcox MD, Zhu H, Knox KW. Streptococcus australis sp. nov., a novel oral streptococcus. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 4):1277-81.
25. Mitchell J. Streptococcus mitis: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(2):89-98.
26. Komiyama EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, Samaranayake LP, Parahitiyawa NB, Balducci I, et al. Enterococcus Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163001.
27. Lopez-Santacruz HD, Lopez-Lopez A, Revilla-Guarinos A, Camelo-Castillo A,

- Esparza-Villalpando V, Mira A, et al. *Streptococcus dentisani* is a common inhabitant of the oral microbiota worldwide and is found at higher levels in caries-free individuals. *Int Microbiol.* 2021;24(4):619-29.
28. Park OJ, Kwon Y, Park C, So YJ, Park TH, Jeong S, et al. *Streptococcus gordonii*: Pathogenesis and Host Response to Its Cell Wall Components. *Microorganisms.* 2020;8(12).
  29. Huch M, De Bruyne K, Cleenwerck I, Bub A, Cho GS, Watzl B, et al. *Streptococcus rubneri* sp. nov., isolated from the human throat. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(Pt 11):4026-32.
  30. Brennan AA, Harrington A, Guo M, Renshaw CP, Tillett RL, Miura P, et al. Investigating the *Streptococcus sinensis* competence regulon through a combination of transcriptome analysis and phenotypic evaluation. *Microbiology (Reading).* 2022;168(10).
  31. Fernandez Vecilla D, Urrutikoetxea Gutierrez MJ, Diaz de Tuesta Del Arco JL. *Streptococcus cristatus*, an infrequent cause of bacteremia and infective endocarditis. Case report and literature review. *Rev Esp Quimioter.* 2023;36(1):110-3.
  32. Bao X, de Soet JJ, Tong H, Gao X, He L, van Loveren C, et al. *Streptococcus oligofermentans* Inhibits *Streptococcus mutans* in Biofilms at Both Neutral pH and Cariogenic Conditions. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130962.
  33. Saito M, Shinozaki-Kuwahara N, Hirasawa M, Takada K. *Streptococcus oricebi* sp. nov., isolated from the oral cavity of tufted capuchin. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(2):1063-7.
  34. Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. Oral mitis group streptococci: A silent majority in our oral cavity. *Microbiol Immunol.* 2022;66(12):539-51.
  35. Tammaro P, Richard N, Andre B, Andremont A, Mammeri H. First report of human infection due to *Streptococcus devriesei*. *New Microbes New Infect.* 2017;15:72-3.
  36. Kurylek A, Stasiak M, Kern-Zdanowicz I. Virulence factors of *Streptococcus anginosus* - a molecular perspective. *Front Microbiol.* 2022;13:1025136.
  37. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413-37.
  38. Wang F, Li M, Huang L, Zhang XH. Cultivation of uncultured marine microorganisms. *Mar Life Sci Technol.* 2021;3(2):117-20.
  39. Hunter-Cevera J, Karl D, Buckley M. *Marine Microbial Diversity: The Key to Earth's*

- Habitability: This report is based on a colloquium, sponsored by the American Academy of Microbiology, held April 8-10, 2005, in San Francisco, California. American Academy of Microbiology Colloquia Reports. Washington (DC)2005.
40. Ercibengoa M, Goenaga MA, Ardanuy C, Grau I, Garcia-de-la-Maria C, Almela M, et al. Epidemiological and clinical characteristics of *Streptococcus tigurinus* endocarditis. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):291.
  41. Zbinden A, Bostanci N, Belibasakis GN. The novel species *Streptococcus tigurinus* and its association with oral infection. *Virulence.* 2015;6(3):177-82.
  42. Hosokawa M, Iwai N, Arikawa K, Saeki T, Endoh T, Kamata K, et al. Target enrichment of uncultured human oral bacteria with phage-derived molecules found by single-cell genomics. *J Biosci Bioeng.* 2023;136(1):58-66.
  43. Glazunova OO, Raoult D, Roux V. *Streptococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a patient blood culture. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(Pt 5):1127-31.
  44. Pontigo F, Silva C, Moraga M, Flores SV. *Streptococcus massiliensis* in the human mouth: a phylogenetic approach for the inference of bacterial habitats. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):19184-90.
  45. Piscitelli SC, Shwed J, Schreckenberger P, Danziger LH. *Streptococcus milleri* group: renewed interest in an elusive pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992;11(6):491-8.
  46. Mejare B, Edwardsson S. *Streptococcus milleri* (Guthof); an indigenous organism of the human oral cavity. *Arch Oral Biol.* 1975;20(11):757-62.
  47. Fu X, Cheng D, Luo Z, Wagner A, Fitting S, Cong X, et al. Oral Enrichment of *Streptococcus* and its Role in Systemic Inflammation Related to Monocyte Activation in Humans with Cocaine Use Disorder. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2022;17(1-2):305-17.
  48. Oh C, Lee K, Cheong Y, Lee SW, Park SY, Song CS, et al. Comparison of the Oral Microbiomes of Canines and Their Owners Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One.* 2015;10(7):e0131468.



# ANEXOS



**Anexo n°1**  
**Aceptación comité de ética**

## COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



### **DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**

#### **SUJETOS DE ESTUDIO:**

Muestras de 20 estudiantes de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa-Perú.

#### **RIESGO DEL ESTUDIO:**

Mínimo.

#### **OBSERVACIONES, SUGERENCIAS:**

Debe proteger confidencialidad de la data sensible.

#### **DICTAMEN:**

***DICTAMEN FAVORABLE***  
***064 - 2024***

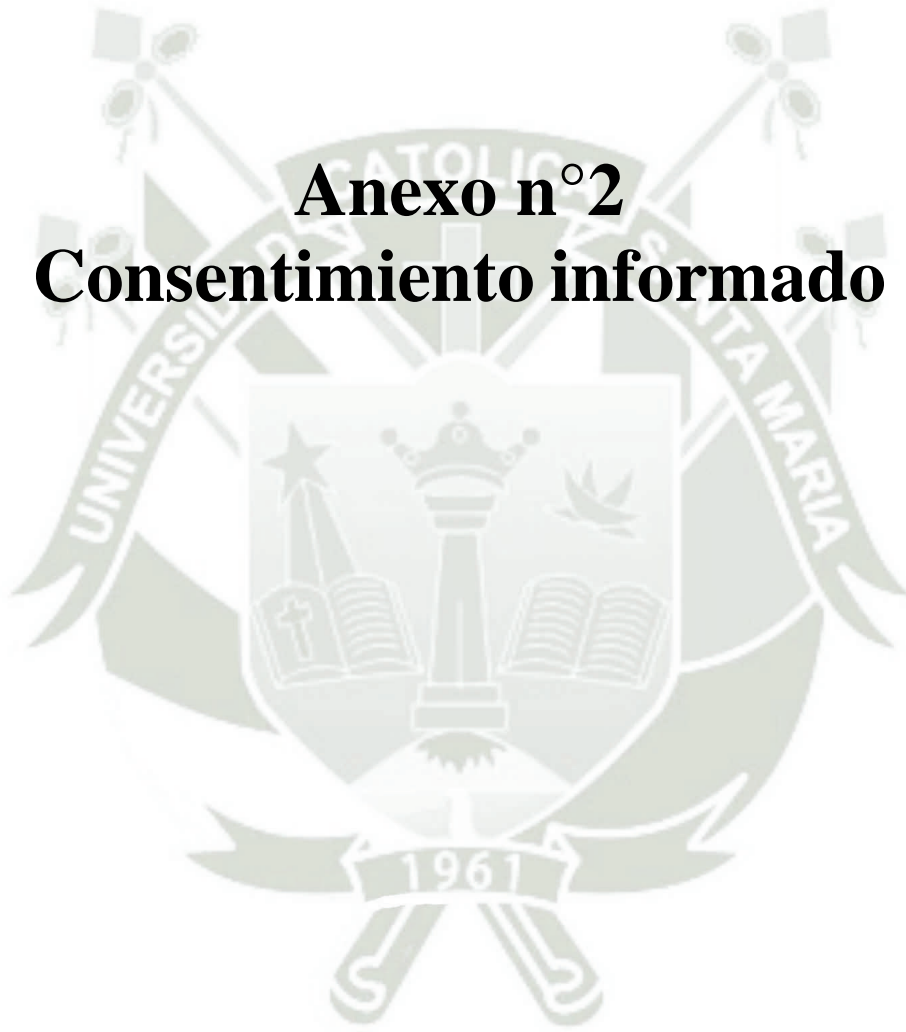


Agueda Muñoz Del Carpio Toia  
Comité Institucional de Ética de la Investigación UCSM

Cualquier duda comunicarse a: [comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com](mailto:comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com)



**Anexo n°2**  
**Consentimiento informado**



**ANÁLISIS DEL MICROBIOMA ORAL USANDO SECUENCIAMIENTO 16S ANTES Y DESPUÉS DEL USO DE UN DENTÍFRICO CON TRICLOSÁN TRICLOSAN EN ESTUDIANTES DEL 5TO AÑO DEL CENTRO ODONTOLÓGICO DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA AREQUIPA - 2024**

Estimado(a) estudiante,

Este estudio titulado Análisis del microbioma usando secuenciamiento 16s antes y después del uso de un dentífrico con triclosán en estudiantes del 5to año del centro odontológico de la universidad Católica de Santa María, trata de determinar la diferencia del microbioma antes y después del uso del triclosán.

El triclosán es un agente antimicrobiano que se encuentra habitualmente en productos de cuidado personal, incluido en las pastas dentales, sin embargo, el uso de dentífricos que contienen triclosán ha sido un tema de interés en el estudio de los efectos sobre el microbioma oral, ya que su función es prevenir la proliferación de bacterias

Es por eso por lo que esta investigación es de gran importancia para determinar si existe algún cambio al usar pasta con triclosán.

Es así, que estás siendo invitado(a) a participar de esta investigación. Si no eres estudiante del 5to año de la Facultad de Odontología de la UCSM, por favor no participes del estudio. Agradecemos tu participación.

Los resultados obtenidos serán divulgados por medio del proyecto de investigación que se está realizando para la obtención de Título de cirujano dentista.

Si estás de acuerdo en participar de la investigación, por favor escribe tu nombre completo y número de DNI al final de esta página, la cuál será el comprobante de tu consentimiento informado. Si necesitas de cualquier aclaración sobre esta investigación o quisieras acceso a nuevas informaciones, puedes entrar en contacto con el investigador responsable del estudio.

**¡TU PARTICIPACIÓN ES MUY IMPORTANTE!**

Yo: \_\_\_\_\_

(nombre completo)

con DNI número \_\_\_\_\_, acepto participar en la investigación.

\_\_\_\_\_  
Firma

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

Yara Luciana Bejarano Andía

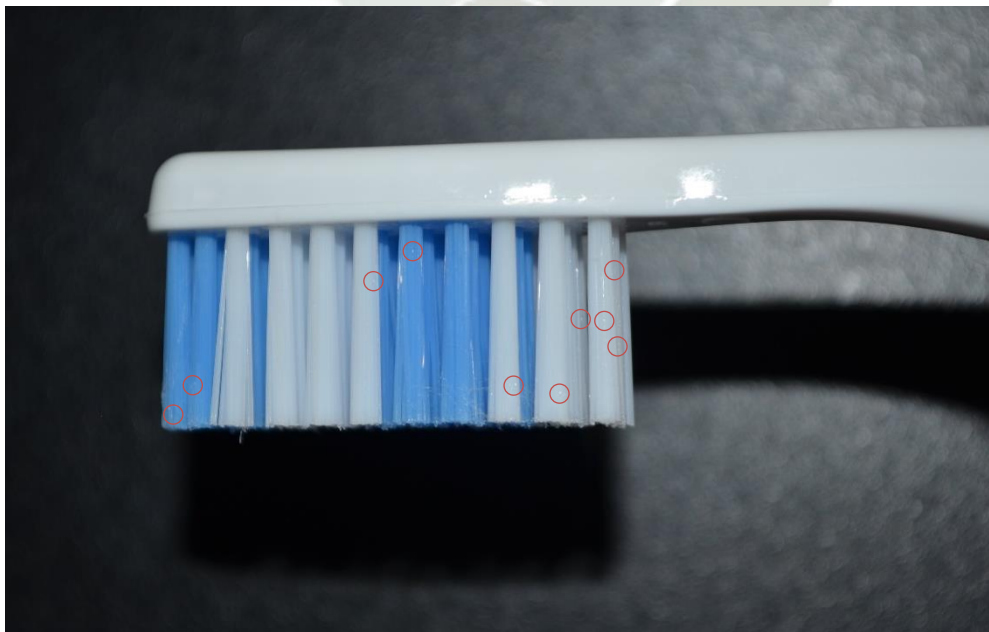
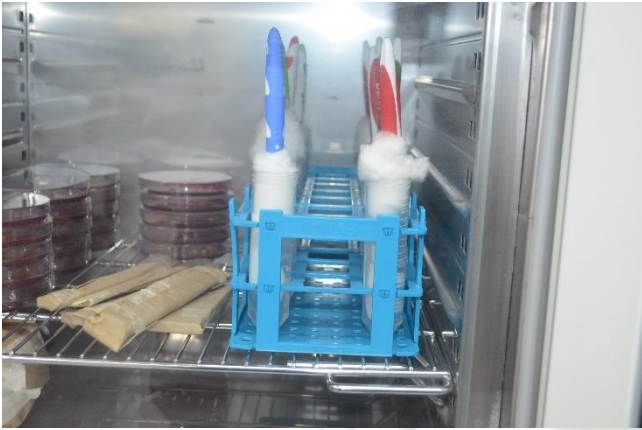
Estudiante de la Facultad de Odontología UCSM

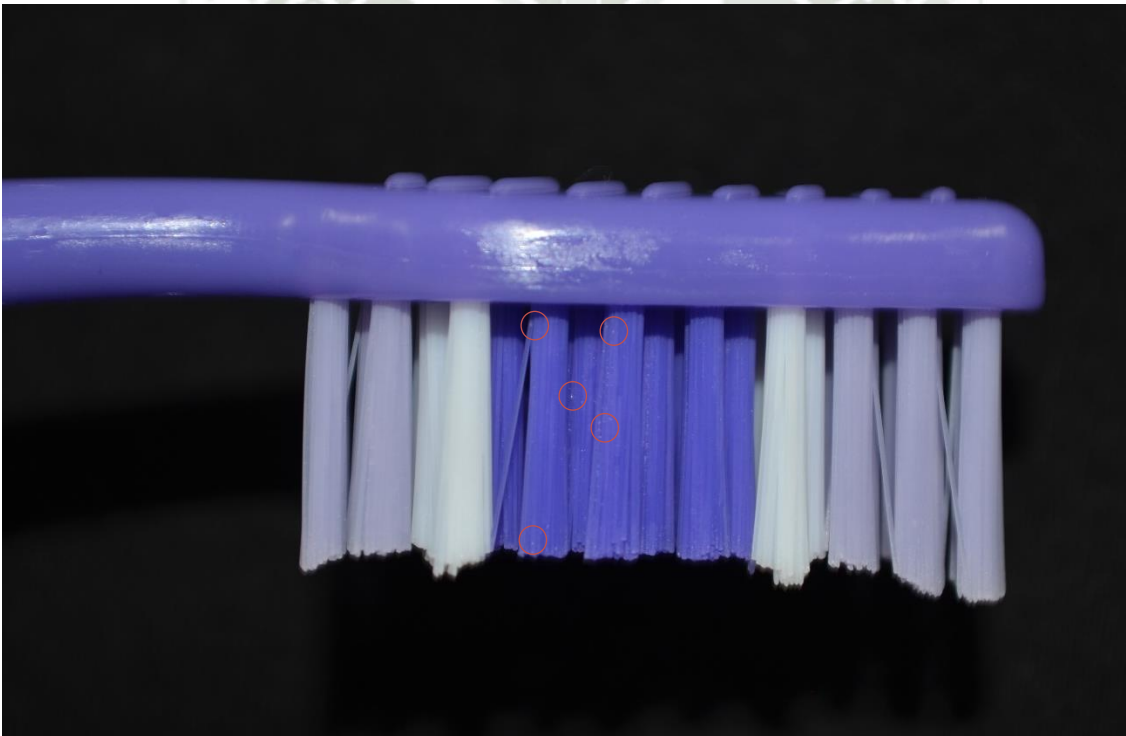
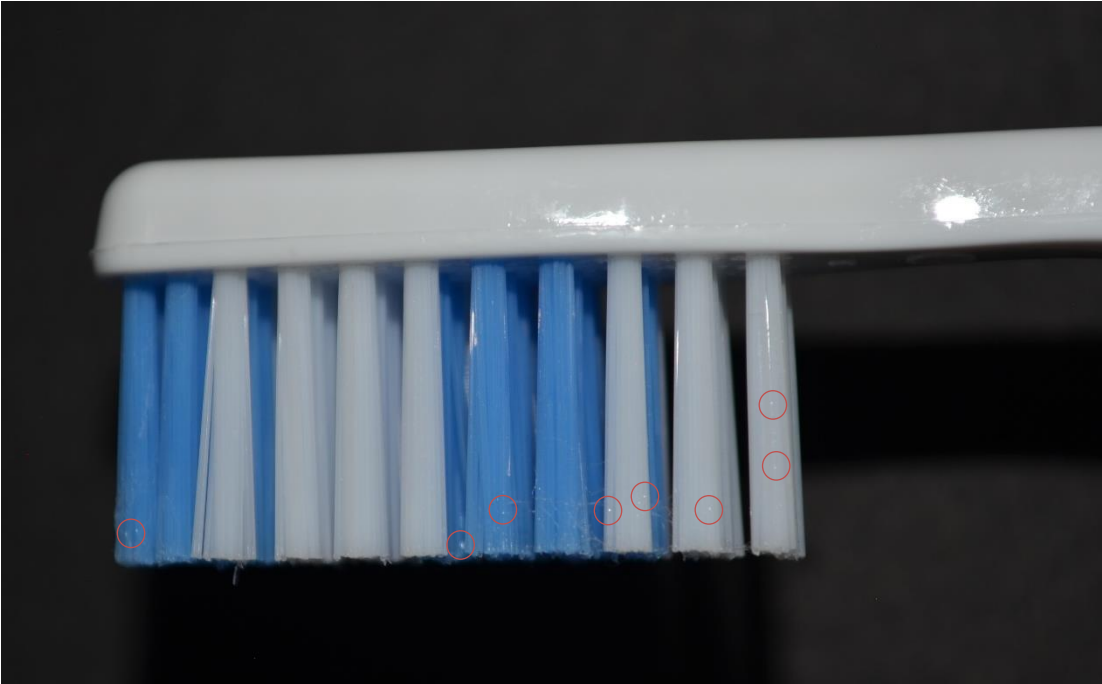
email 71266630@ucsm.edu.pe

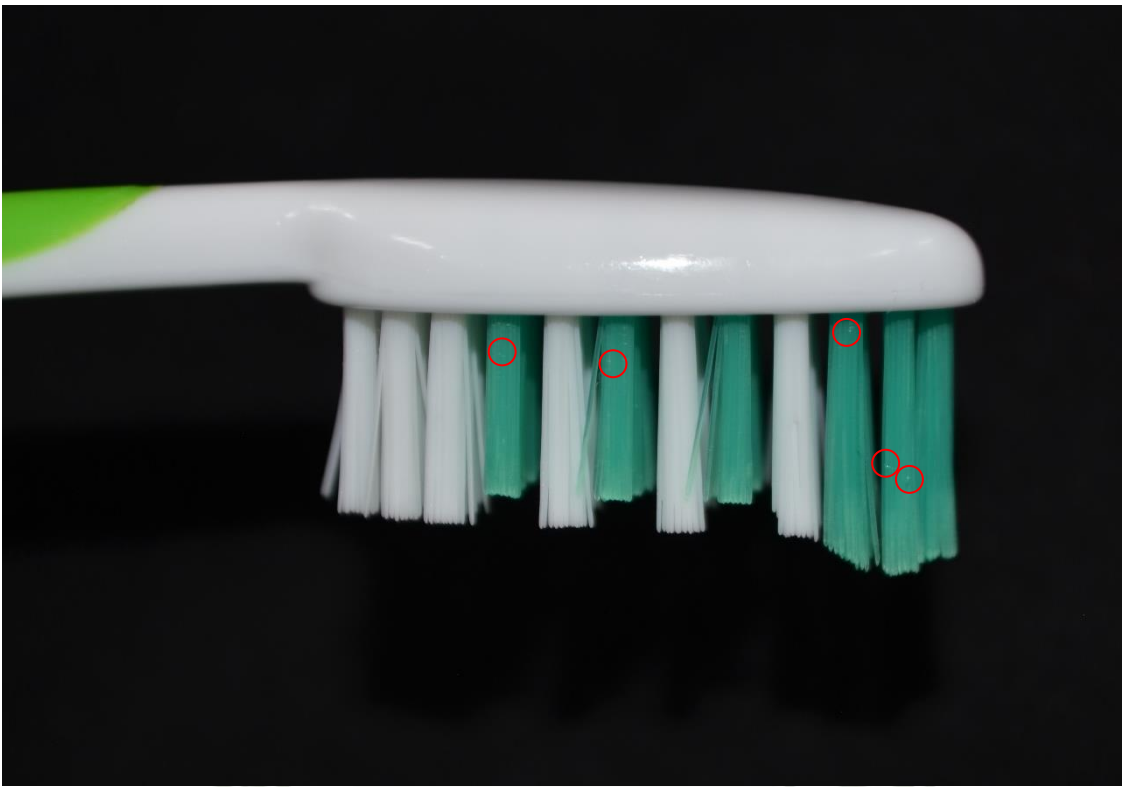
celular: 949749609

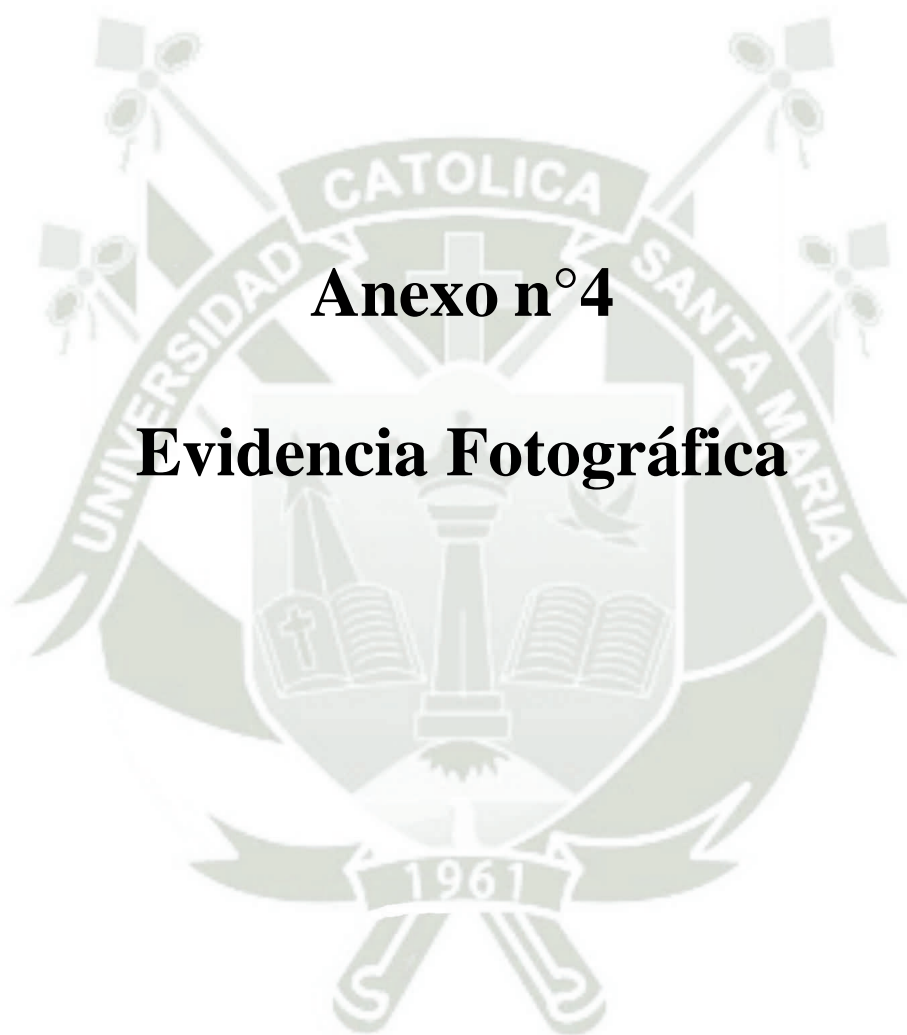


**Anexo n°3**  
**Crecimiento de *Streptococcus Mutans***





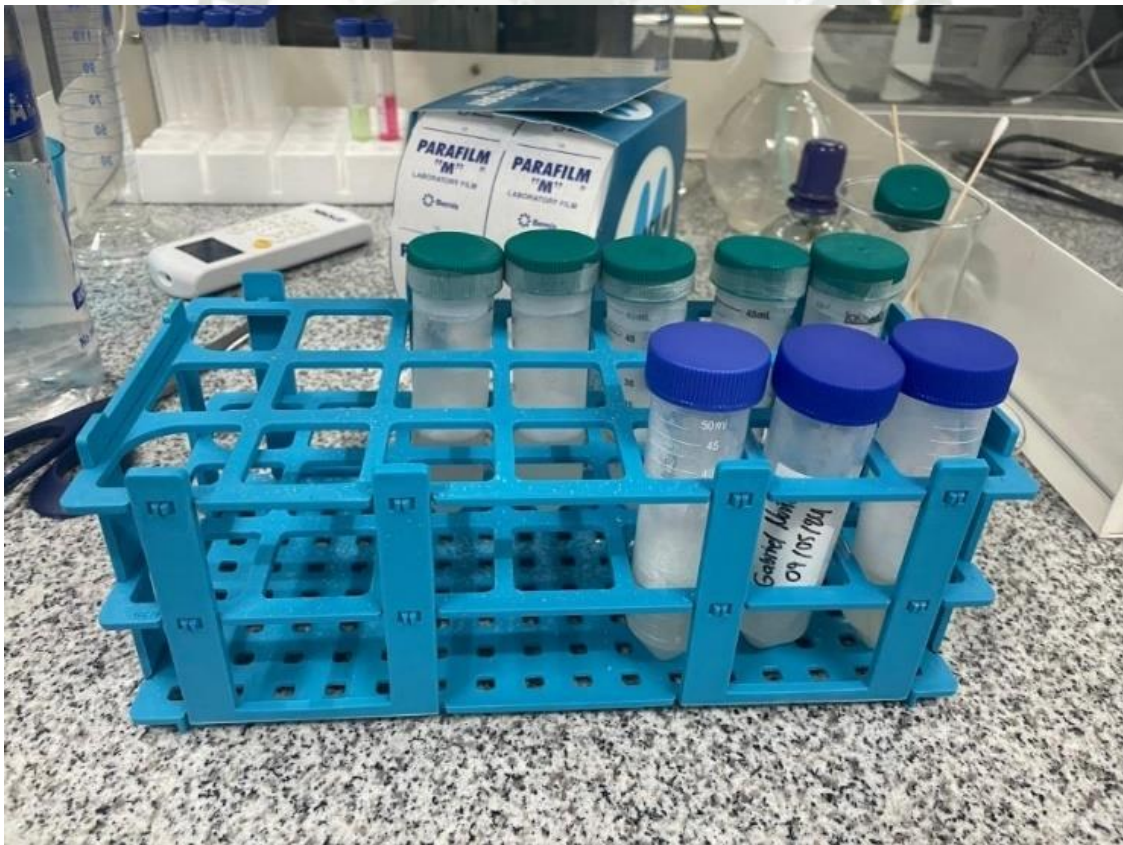
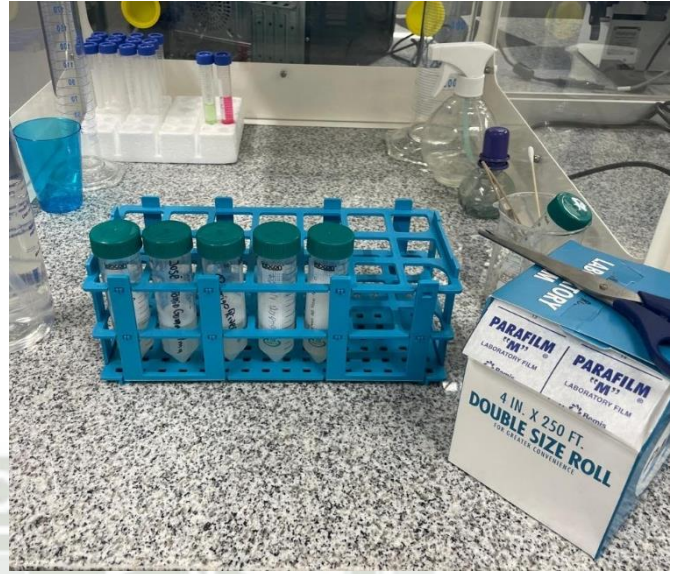




## **Anexo n°4**

# **Evidencia Fotográfica**







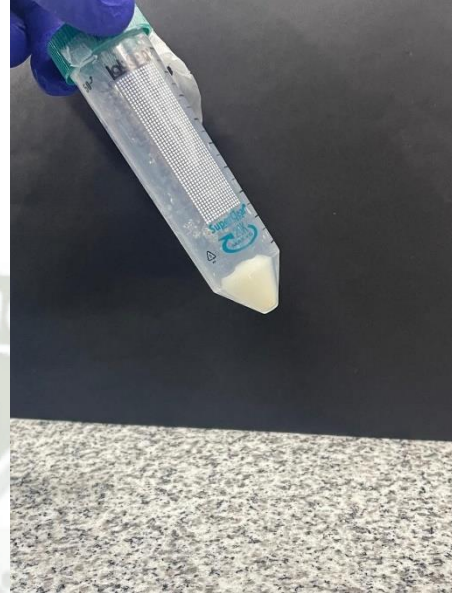


**Anexo n°5**  
**Protocolo de extracción de ADN**

1. CHOQUE TERMICO (forma para que se rompan las bacterias para extraer el ADN), tiempo del choque térmico hasta descongelar aproximadamente 8 minutos.



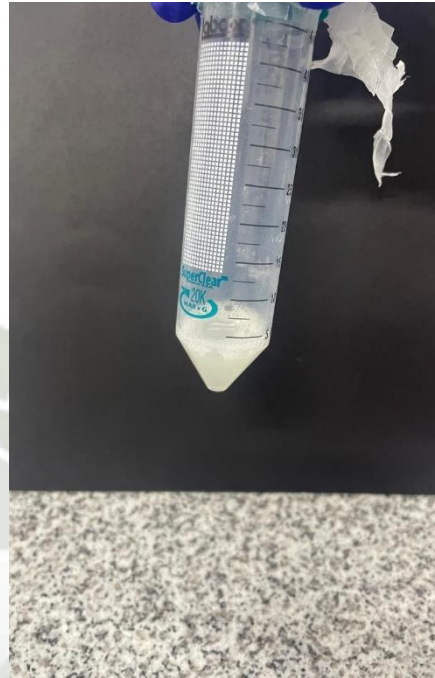
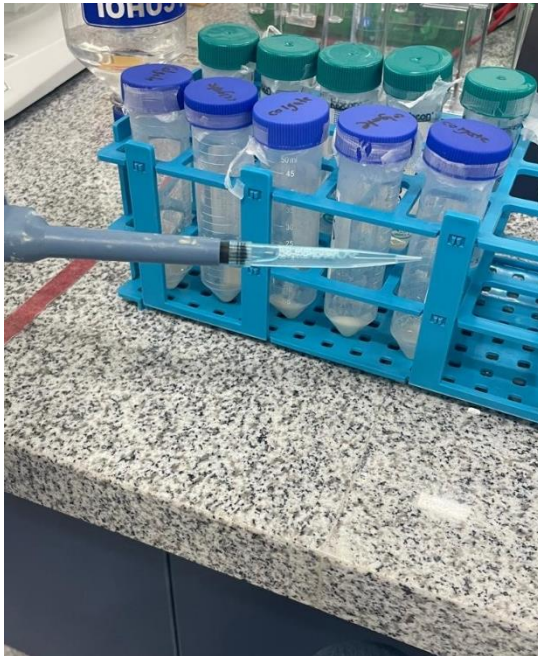
2. Centrifuga 2500 por 15 minutos



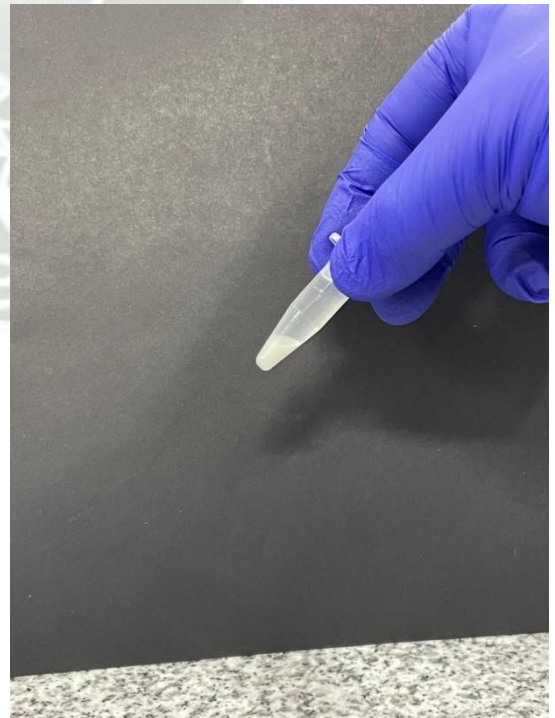
3. Solución lítica (paralizar cosas) 2ml



4. Poner 1.5 ml de solución dentro del tubo de ensayo



5. Centrifugar 15min



6. Poner 700ml de Buffer de lavado N. 1



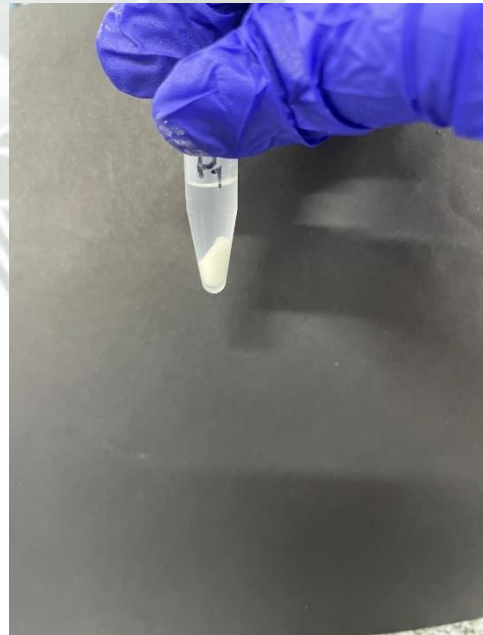
7. Centrifugar 15 min



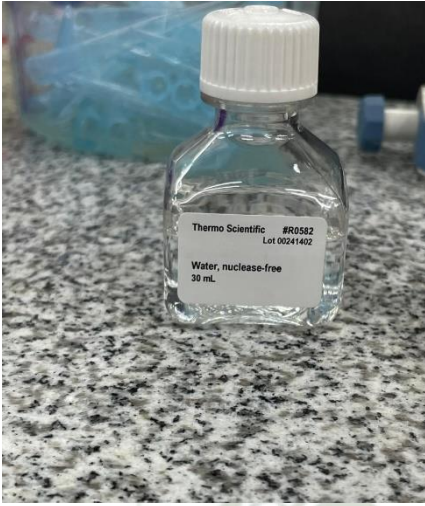
8. Poner 700ml de Buffer de lavado N. 2



9. Centrifugar 15minn



10. Poner 500ml de Nuclease-free

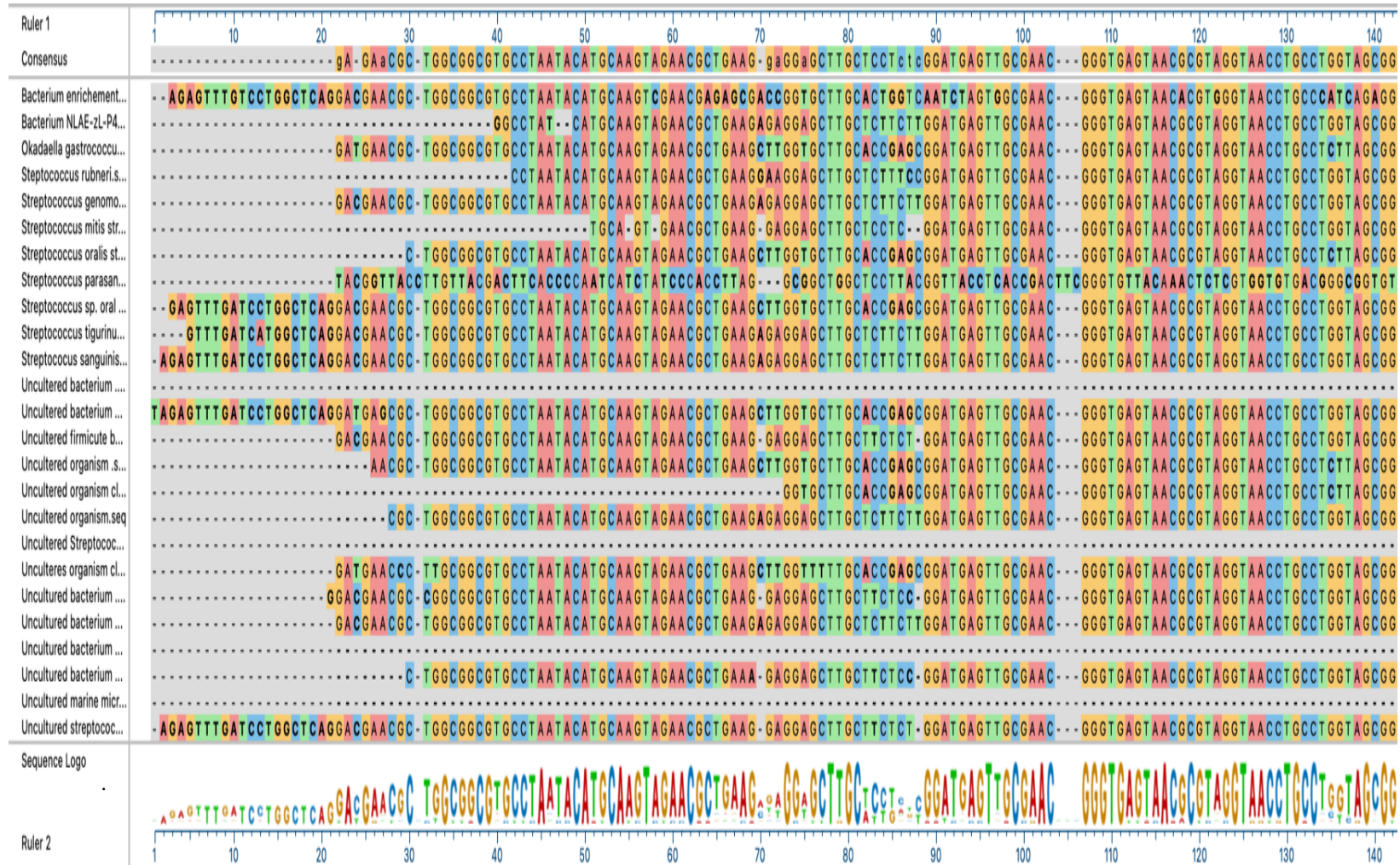




**Anexo n°6**

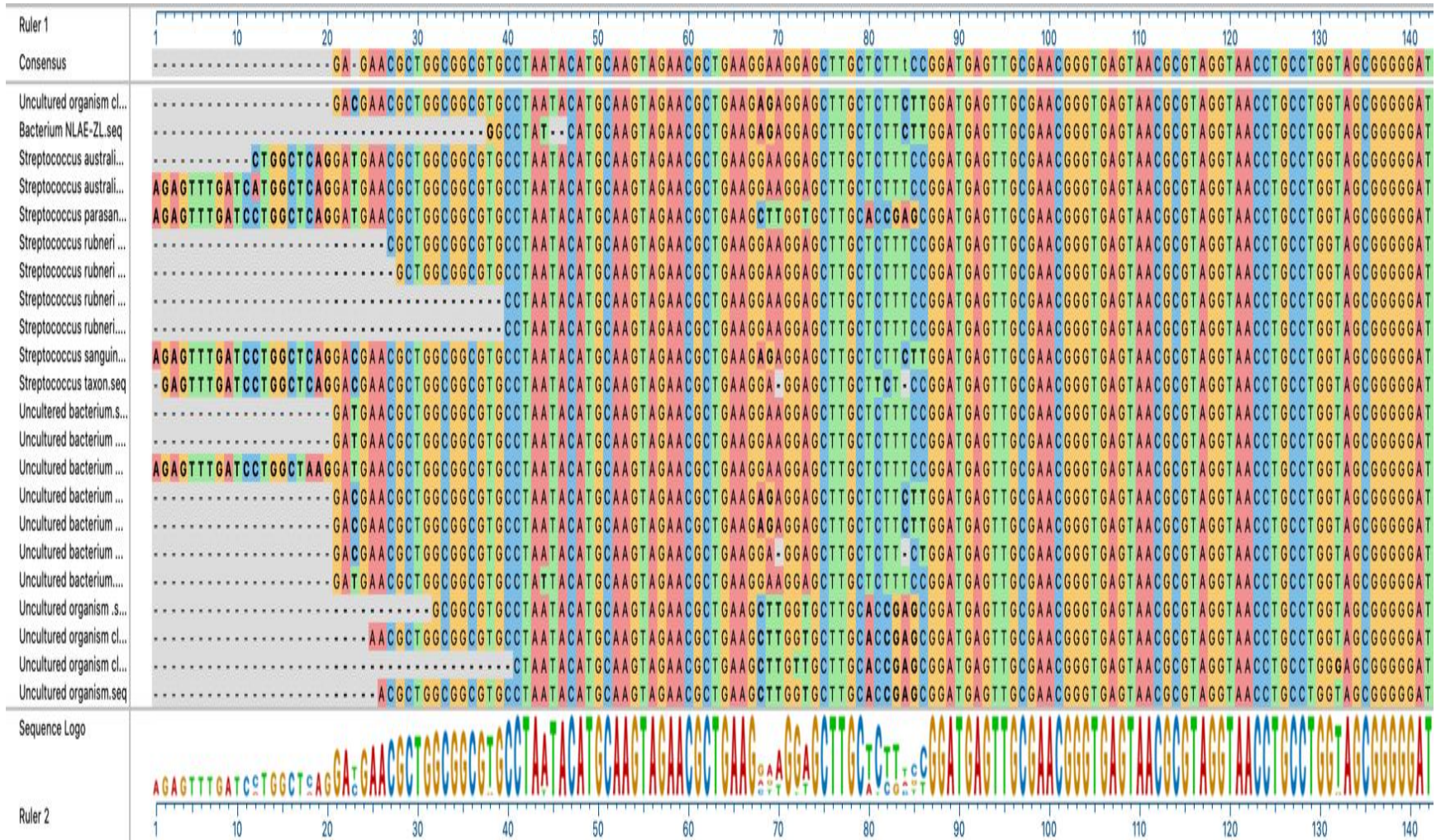
**ALINEAMIENTO FILOGENETICO**

TABLA 1: Primera secuencia utilizando, secuenciamiento de DNA del microbioma de la cavidad oral, usando la subunidad 16S, sin pasta dental.



Alineamiento realizado en el Mega Alain (DNA STAR) de los nucleótidos, utilizando Crustal W.

TABLA 2: Segunda secuencia utilizando, secuenciamiento de DNA del microbioma de la cavidad oral, usando la subunidad 16S, sin pasta dental



Alineamiento realizado en el Mega Alain (DNA STAR) de los nucleótidos, utilizando Crustal W.

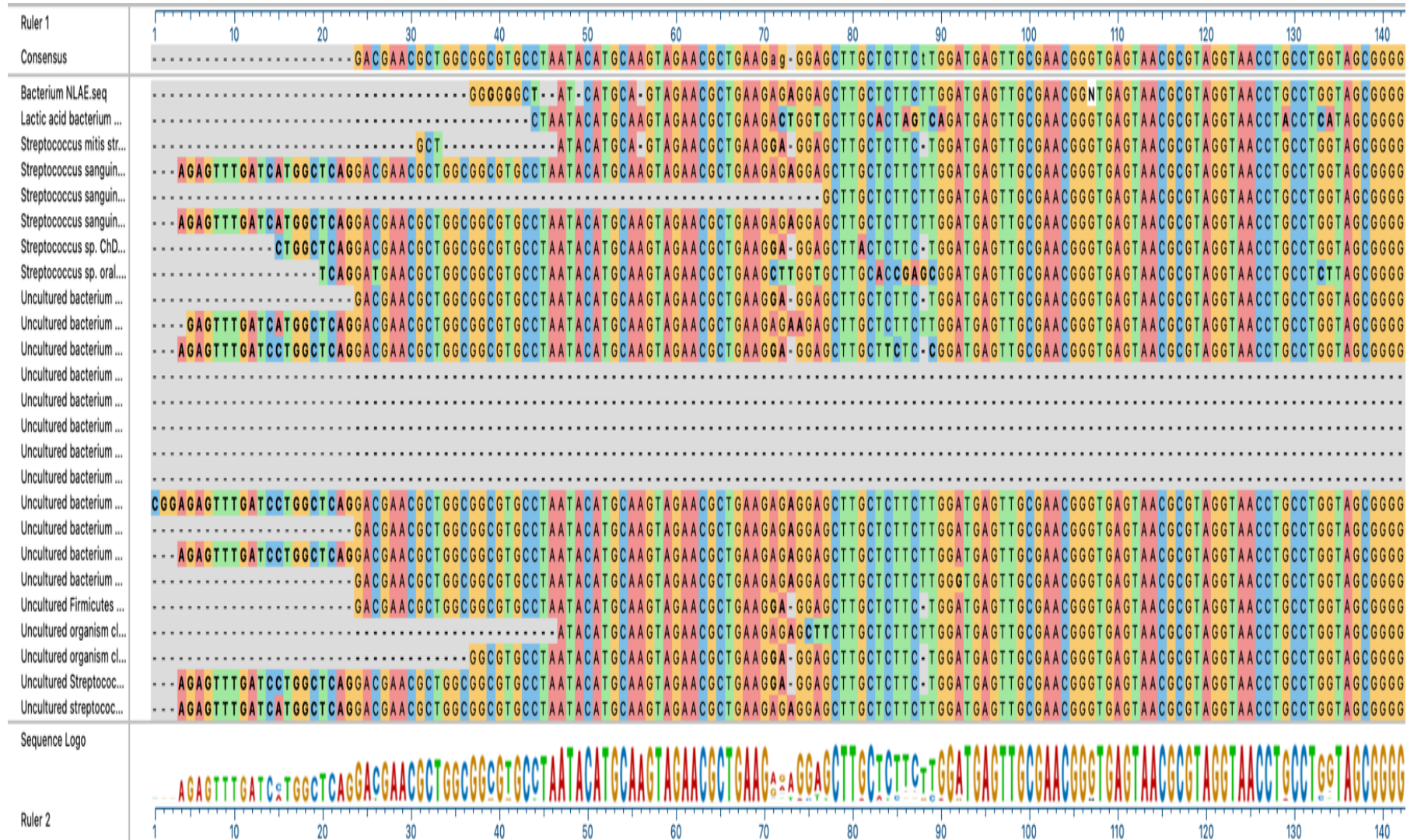
TABLA 3: Tercera secuencia utilizando, secuenciación de DNA del microbioma de la cavidad oral, usando la subunidad 16S, sin pasta dental



Alineamiento realizado en el Mega Alain (DNA STAR) de los nucleótidos, utilizando Crustal W.

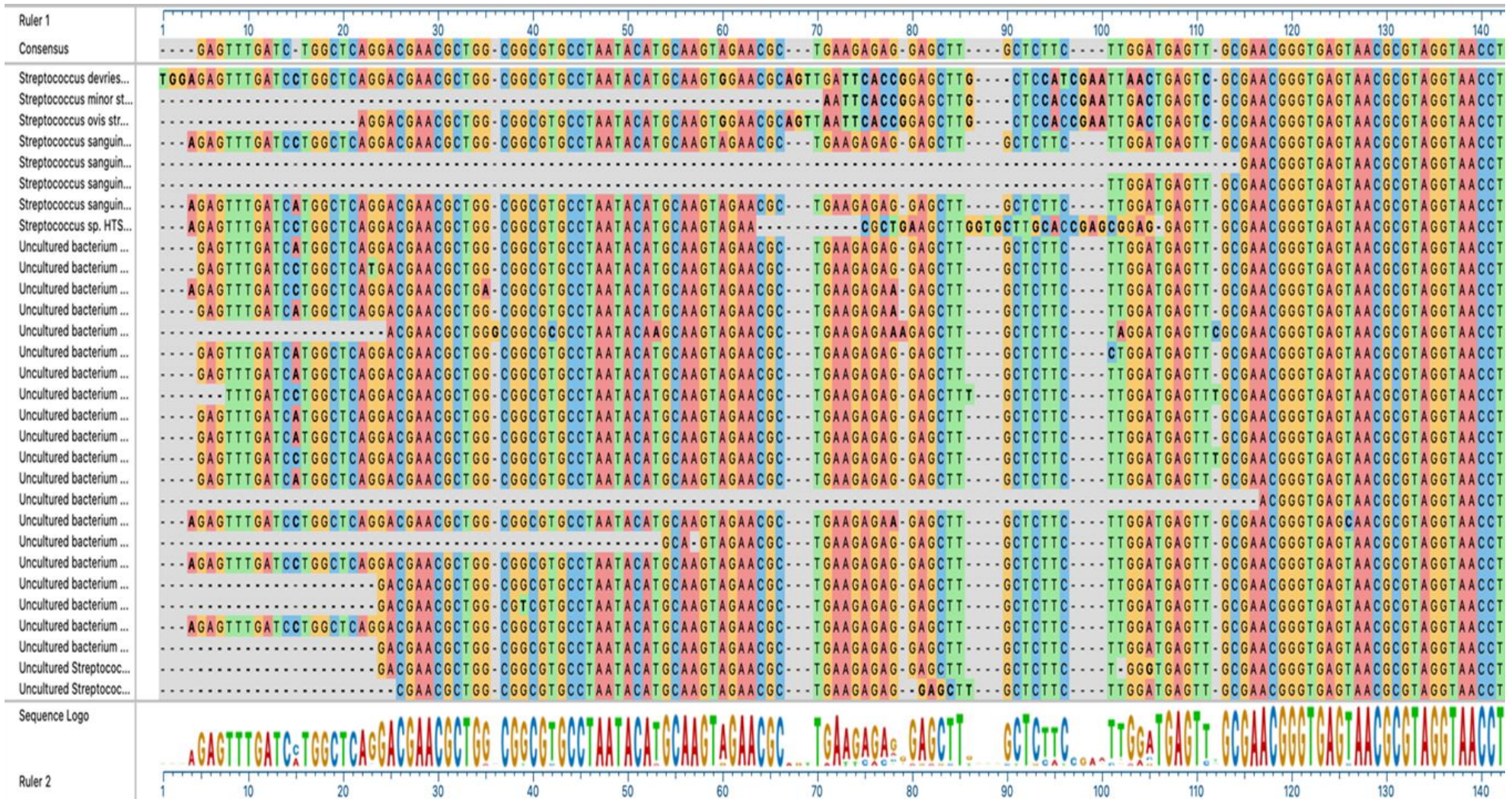


TABLA 5: Quinta secuencia utilizando, secuenciamiento de DNA del microbioma de la cavidad oral, usando la subunidad 16S, con pasta dental



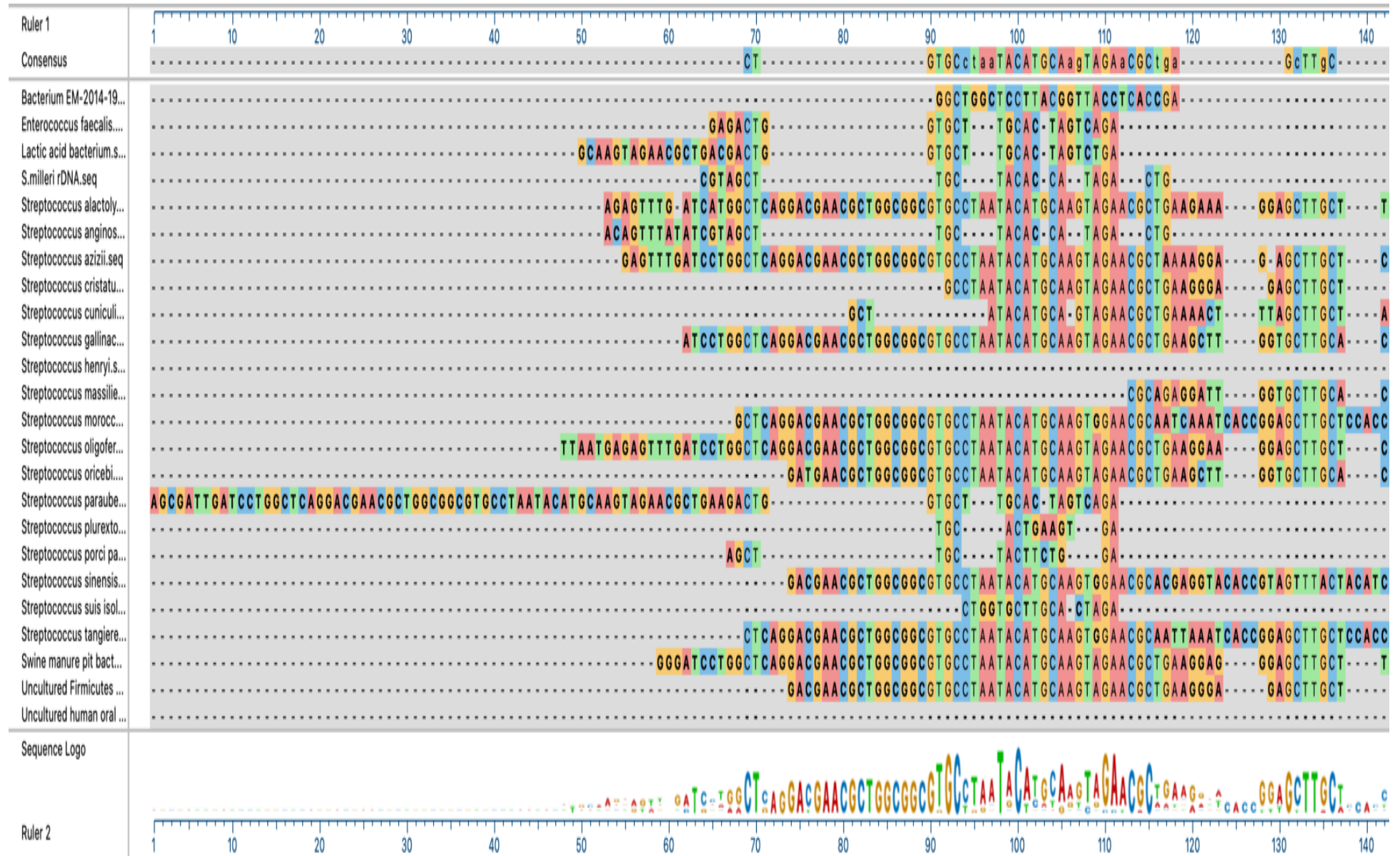
Alineamiento realizado en el Mega Alain (DNA STAR) de los nucleótidos, utilizando Crustal W.

TABLA 6: Sexta secuencia utilizando, secuenciamiento de DNA del microbioma de la cavidad oral, usando la subunidad 16S, con pasta dental



Alineamiento realizado en el Mega Alain (DNA STAR) de los nucleótidos, utilizando Crustal W.

TABLA 7: Setima secuencia utilizando, secuenciamiento de DNA del microbioma de la cavidad oral, usando la subunidad 16S, con pasta dental



Alineamiento realizado en el Mega Alain (DNA STAR) de los nucleótidos, utilizando Crustal W.

