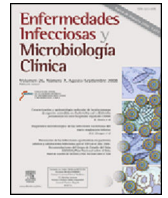




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Perfil bacteriano del biofilm dental supragingival en niños con dentición temporal y mixta temprana utilizando la técnica de secuenciación de próxima generación (HOMINGS)



Jonathan Harris-Ricardo<sup>a,\*</sup>, Luis Fang<sup>a</sup>, Alejandra Herrera-Herrera<sup>a</sup>, Natalia Fortich-Mesa<sup>a</sup>, Doris Olier-Castillo<sup>b</sup>, Diana Cavanzo-Rojas<sup>c</sup> y Roberto González-Quintero<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología Oral, Clínica Odontológica de la Corporación Universitaria Rafael Núñez, Cartagena, Colombia

<sup>b</sup> Servicio de Bacteriología, Corporación Universitaria Rafael Núñez, Cartagena, Colombia

<sup>c</sup> Servicio de Microbiología, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 12 de junio de 2018

Aceptado el 23 de octubre de 2018

On-line el 10 de diciembre de 2018

#### Palabras clave:

Biopelículas  
Dentición mixta  
Diente temporal  
Bacterias

### R E S U M E N

**Objetivo:** Describir el perfil bacteriano del biofilm supragingival de niños con dentición temporal (NDT) y dentición mixta temprana (NDMT), con la técnica de secuenciación de próxima generación HOMINGS. **Método:** Se realizó un estudio descriptivo comparativo con 30 niños de 5 a 7 años de edad sistémicamente sanos de escuelas públicas de Cartagena (Colombia). Todos los participantes estaban libres de caries, según los criterios del Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries (ICDAS II) y sin experiencia de caries según el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (DCPO). Se recolectaron muestras de biofilm supragingival. Se extrajo el ADN bacteriano y se usó para su análisis mediante HOMINGS (identificación de microorganismos orales humanos utilizando secuenciación de próxima generación) basado en la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA con la plataforma Illumina MiSeq. **Resultados:** Se identificaron 360 especies específicas y 65 géneros específicos de las sondas: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* y *Fusobacterium* (29,2% del total de ADN bacteriano presente), mientras que en el grupo de dentición mixta temprana se encontraban *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *TM7* y *Porphyromonas* (24,5% del ADN bacteriano presente). Las especies bacterianas con mayor abundancia relativa en el microbioma oral de biofilm de NDT fueron *Streptococcus sanguinis*, *Rothia aeria*, *Gemella haemolysans*, mientras que en NDMT fueron *S. sanguinis*, *Leptotrichia* sp. *HOT-417*, *Leptotrichia* sp. *HOT-498*. El índice de diversidad de Shannon fue 2,77 (DE = 0,26) para NDT y 3,01 (DE = 0,39) para NDMT (p = 0,06). **Conclusiones:** El análisis del perfil bacteriano del biofilm dental supragingival en niños con NDMT mediante HOMINGS mostró baja diversidad microbiológica tanto en presencia como en abundancia relativa a nivel de género y de especies bacterianas.

© 2018 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

## Bacterial profile of the supragingival dental biofilm in children with deciduous and early mixed dentition using next generation sequencing (HOMINGS) technique

### A B S T R A C T

**Objective:** Tdescribe the bacterial profile of the supragingival biofilm of children with temporary dentition (CTD) and early mixed dentition (CEMD), with the next-generation sequencing (HOMINGS) technique. **Method:** A comparative descriptive study was carried out with 30 systemically healthy children aged between 5 and 7 years old from public schools in Cartagena-Colombia. All participants were caries-free applying the criteria of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II) and had no caries experience according to the Decayed, Missing and Filled Teeth (DMFT) index. Supragingival biofilm samples were collected. Bacterial DNA was extracted and used for analysis using HOMINGS (Human Oral Microbe Identification using Next-Generation Sequencing) based on the sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene using the Illumina MiSeq platform (V3-V4 primers).

#### Keywords:

Biofilms  
Mixed dentition  
Deciduous teeth  
Bacteria

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: j.harris.r@hotmail.com (J. Harris-Ricardo).

**Results:** A total of 360 species-specific and 65 genus-specific probes were identified. The bacterial genus most predominant in CTD were *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* and *Fusobacterium* (29.2% of all bacterial DNA present), while in CEMD the most predominant were *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *TM7* and *Porphyromonas* (24.5% of all bacterial DNA present). The bacterial species with the highest relative abundance in the oral biofilm microbiome from CTD were *Streptococcus sanguinis*, *Rothia aerea*, *Gemella haemolysans*, while in CEMD they were *S. sanguinis*, *Leptotrichia* spp. *HOT-417* and *Leptotrichia* spp. *HOT-498*. The Shannon diversity index was 2.77 (SD = 0.26) for CTD and 3.01 (SD = 0.39) for CEMD ( $P = 0.06$ ). **Conclusions:** The analysis of the bacterial profile of the supragingival dental biofilm in children with DMFT, by means of HOMINGS showed low microbiological diversity both in presence and in relative abundance in terms of genus as well as bacterial species.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

## Introducción

El microbioma humano juega un papel importante en el bienestar y el estado de salud. Se ha hecho en los últimos años un gran esfuerzo en la caracterización de las diferentes comunidades microbianas que colonizan el cuerpo humano; entre otros sitios, la cavidad oral, que representa una de las más diversas comunidades microbianas asociadas con cualquiera de los sitios humanos<sup>1,2</sup>.

Con el advenimiento de técnicas moleculares de la identificación de bacterias orales basadas en el ADN, se ha demostrado que la microbiota oral es mucho más compleja y diversa de lo que originalmente se había previsto<sup>3</sup>. La cavidad oral está colonizada por más de 700 especies de microorganismos, el 35% de los cuales son aún no cultivables. Dicha comunidad microbiana puede diferir entre la infancia y la edad adulta<sup>4</sup>.

Los biofilm son acumulación heterogénea de una comunidad microbiana, rodeada por una matriz intercelular de polímeros. Estos microorganismos pueden adherirse o depositarse sobre las paredes de los dientes, en la mucosa oral y en la saliva, entre otros<sup>5</sup>. Algunos colonizadores de dientes y favorecedores en la formación del biofilm oral son *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* y *S. oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. parasanguis*, *Neisseria* spp., *Prevotella loescheii*, *P. intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y otros<sup>6,7</sup>.

La técnica de secuenciación de próxima generación HOMINGS (*Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing*) fue desarrollada recientemente y permite la identificación simultánea a nivel de especie de casi 600 taxones bacterianos orales. Entre sus ventajas: es computacionalmente eficiente, rápida, reproducible y puede identificar la mayoría del microbioma oral a nivel de especie<sup>8</sup>. HOMINGS se ha utilizado en varias investigaciones recientes, Richards et al., en el 2017, investigaron el microbioma de la placa dental en niños con diferentes estados de caries<sup>9</sup> y Belstrom et al. en el 2016 estudiaron la estabilidad temporal del microbiomas salivales<sup>10</sup>.

El propósito del presente estudio fue identificar el perfil bacteriano del biofilm dental en niños con dentición temporal y mixta temprana, aplicando la técnica de secuenciación de próxima generación HOMINGS, ya que la tecnología proporcionaría información más completa sobre el bacterioma supragingival.

## Métodos

Modelo de estudio descriptivo de corte transversal en el que se describió el perfil bacteriano del biofilm oral en niños con dentición temporal y con dentición mixta temprana. La población de estudio fueron niños entre los 5 y 7 años de edad, de 3 instituciones de educación primaria en la ciudad de Cartagena de Indias (Colombia). El tamaño de la muestra se determinó mediante el *software* estadístico Epidat v. 4.0. Para esto se tuvo en cuenta una

prevalencia esperada de caries en la región caribe del 90%, según se reporta en ENSAB IV<sup>11</sup>, con un nivel de confianza del 95% y error del 5%. La muestra estuvo constituida por 30 niños.

Se excluyeron niños con enfermedad sistémica, hematológica, autoinmune, que estén bajo tratamiento farmacológico al menos tres meses anteriores al inicio del estudio, que presenten malformaciones congénitas involucrado la cavidad oral, que la última visita al odontólogo fuese menos de seis meses y haber recibido profilaxis dental, sellantes y/o topicaciones de flúor en gel o barniz durante este tiempo, ya que estos procedimientos puede modificar el microambiente oral.

Este proyecto se desarrolló en el marco del proyecto «Caracterización del microbioma oral en saliva y biopelícula bacteriana de niños con lesiones cariosas. Estudio de casos y controles prospectivo», código N.º 141965741160, el cual fue financiado por Colciencias (contrato 673-2014) y ejecutado por la Corporación Universitaria Rafael Núñez. Las actividades aquí descritas, la muestra de estudio y la financiación son completamente derivadas del proyecto antes mencionado.

### Técnicas y procedimientos para recolectar la información

Se recolectaron muestras de biofilm supragingival en niños sanos, en el primer molar permanente, con dentición mixta temprana y en el segundo molar caduco en niños con dentición temporal. En aquellos casos en los que el diente no presentaba biofilm supragingival, se recolectó placa de las superficies cercanas. El biofilm supragingival se recolectó con un aplicador y se colocó en tubos de 1,5 mL con 150  $\mu$ L de *buffer* TE y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### Extracción de ADN microbiano

Para la extracción de ADN bacteriano se suspendieron las muestras (biofilm) en 150  $\mu$ L de *buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 1 M EDTA, pH 8,0) y 1  $\mu$ L de Ready-Lyse Lysozyme (Epicentre Cat. No. R1802 M, EE. UU.), que se dejó incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ L de solución de lisis TyC 2 X y 1  $\mu$ L de proteinasa K. Se dejó incubar por 30 min a  $65^{\circ}\text{C}$  bajo agitación continua.

Se colocaron las muestras en hielo durante 3-5 min. Se agregó 175  $\mu$ L del reactivo de precipitación de proteína MPC a 300  $\mu$ L de las muestras lisadas; se agitó vigorosamente por 10 s. Se centrifugaron las muestras por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  a 10.000 xg. Se transfirió el sobrenadante a tubos de 1,5 mL estériles. Se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol al sobrenadante recuperado y se mezclaron de 30 a 40 veces. Se incubó por 10 min sobre hielo. Se centrifugó a 10.000 xg a  $4^{\circ}\text{C}$ ; se descartó el isopropanol evitando la pérdida del precipitado. Se enjuagó el precipitado con 500  $\mu$ L de etanol al 75%, se mezcló, se centrifugó brevemente y se descartó el etanol; se repitió este paso. Se resuspendió el ADN con 25  $\mu$ L de *buffer* TE. A cada

muestra se le analizó la concentración y calidad del ADN mediante un espectrofotómetro Multiskan Go® (ThermoFisher Scientific) bajo densidades ópticas de 260/280. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### Identificación bacteriana

El perfil microbiológico obtenido del ADN purificado de las muestras de biofilm se realizó mediante la tecnología HOMINGS (<http://homings.forsyth.org>). HOMINGS es una técnica molecular basada en secuenciación de nueva generación que emplea la plataforma MiSeq System (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.), que secuencia la región 16S rRNA V3-V4 usando cebadores descritos<sup>12</sup>. Esta técnica fue realizada en el instituto Forsyth (Boston, MA, EE. UU.) que, en combinación con el programa ProbeSeq for HOMINGS, Programa BLAST personalizado (Forsyth Institute, Cambridge, MA, EE. UU.) es capaz de identificar simultáneamente alrededor de 600 taxones orales Belstrom<sup>12</sup>. La base de datos de ProbeSeq contiene secuencias de sondas (17–40 bases) recogidas en la base de datos de HOMD (*Human Oral Microbiome Database*), en concreto, 598 sondas especie-específicas y 94 sondas género-específicas (sondas dirigidas a 2 o más taxones estrechamente relacionados dentro del mismo género).

### Análisis estadístico

Los datos sociodemográficos como género, grado escolar, abundancia relativa y presencia del organismo son reportados mediante tablas de frecuencia. La variable edad se describe en valores de media y desviación estándar (DE). El contraste entre variables demográficas y tipo de dentición se analizó mediante la prueba de Chi cuadrado de Pearson. A partir del número de lecturas obtenidas por muestra, se estimó el índice de diversidad microbiológica  $\alpha$  de Shannon. El contraste de este índice entre los grupos de estudio se realizó mediante la prueba t de Student. Para estos análisis, un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

La abundancia relativa y la presencia de las especies y géneros bacterianos no mostraron distribución normal conforme la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. El contraste de estas variables entre los grupos según el tipo de dentición se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Benjamini-Hochberg para comparaciones múltiples. Esta fue usada para controlar el descubrimiento de falsos positivos del 10% (66). Para estos análisis, un valor de  $p$  ajustado  $< 0,001$  fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos SPSS v20 (IBM, Nueva York, EE. UU.) y MeV 4 8 1 Multi Experiment Viewer. [www.tm4.org](http://www.tm4.org)<sup>13,14</sup>.

**Tabla 1**  
Géneros bacterianos según tipo de dentición

Nombre del organismo	D. temporal			D. mixta			p (R%)	p (P%)
	%P	R%	DE (%)	%P	R%	DE (%)		
<i>Actinomyces</i> género sonda 3	100	1,514	1,722	100	0,632	0,774	0,126	1,000
<i>Fusobacterium</i> género sonda 3	100	0,357	0,361	100	0,781	1,903	0,806	1,000
<i>Fusobacterium</i> género sonda 4	100	0,769	0,710	100	0,604	0,527	0,713	1,000
<i>Leptotrichia</i> género sonda 3	87	0,408	0,774	100	1,432	2,214	0,254	0,539
<i>Neisseria</i> género sonda 2	100	0,327	0,828	100	0,784	1,657	0,935	1,000
<i>Porphyromonas</i> género sonda 2	100	0,645	0,762	100	1,005	1,694	1,000	1,000
<i>Rothia</i> género	100	0,593	1,135	100	0,344	0,453	0,486	1,000
<i>Streptococcus</i> género sonda 1	100	3,328	2,535	100	2,040	2,739	0,033	1,000
<i>Streptococcus</i> género sonda 4	100	22,668	11,474	100	18,665	12,935	0,389	1,000
TM7 género	100	0,388	0,536	100	1,421	2,825	0,217	1,000
<i>Veillonella</i> género sonda 2	100	0,981	1,903	100	0,835	0,934	0,461	1,000

$p < 0,001$ . Prueba U de Mann-Whitney con corrección de Benjamini-Hochberg (tasa de descubrimientos falsos: 10%) de las comparaciones múltiples. Se muestran aquellos géneros bacterianos con una proporción relativa promedio  $\geq 0,3\%$  en el microbioma de los individuos.

### Consideraciones éticas

Antes de iniciar cualquier procedimiento los padres o tutores legales aprobaron la participación del menor mediante un consentimiento informado. De igual forma, se indagó en el niño su voluntad de participación en el estudio mediante un asentimiento. Según la resolución 008430 de 1993, el presente estudio representa un riesgo mayor que el mínimo para los participantes: los posibles riesgos fueron plasmados con claridad en el consentimiento informado.

### Resultados

Formaron parte del estudio 30 niños: 15 con dentición temporal y 15 con dentición mixta temprana. Se observó un promedio de edad de  $6,23 \pm 0,8$  años de edad. El 46,7% ( $n = 14$ ) eran de género masculino y el 53,3% ( $n = 16$ ) de género femenino. Estaban matriculados en 3 instituciones de educación básica primaria ubicadas en la Localidad 1 Histórica y del Caribe Norte en la ciudad de Cartagena (Bolívar).

El análisis HOMINGS permitió identificar el perfil bacteriano en muestras de biofilm oral procedentes de superficies supragingivales y se pudo observar la diversidad bacteriana de algunas especies bacterianas identificadas y su contribución (proporción o abundancia relativa) en el microbioma de cada individuo. En total, 65 sondas género-específicas amplificaron en las muestras de estudio; estas recopilaron información de 44 géneros bacterianos presentes en el biofilm oral analizado. Entre estos, los géneros de *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *TM7*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Rothia*, *Selenomonas* y *Centipeda*, *Leptotrichia*, *Gemella*, *Actinomyces* y *Corynebacterium* estuvieron presentes en el 100% de las muestras. Por su parte, la abundancia relativa (proporción relativa) de cada uno de los géneros denota la contribución de estos sobre el perfil bacteriano del biofilm oral. Por consiguiente, *Streptococcus* sonda 4 ( $20,67\% \pm 12,1$ ), *Streptococcus* sonda 1 ( $2,68\% \pm 2,67$ ), *Actinomyces* sonda 3 ( $1,07\% \pm 1,3$ ), *Leptotrichia* sonda 3 ( $0,96\% \pm 1,7$ ), *Veillonella* sonda 2 ( $0,91\% \pm 1,4$ ), *TM7* ( $0,90\% \pm 2,0$ ) y *Porphyromonas* sonda 2 ( $0,82\% \pm 1,3$ ) son los 6 géneros bacterianos más abundantes en el biofilm oral, que representan el 28,02% de este.

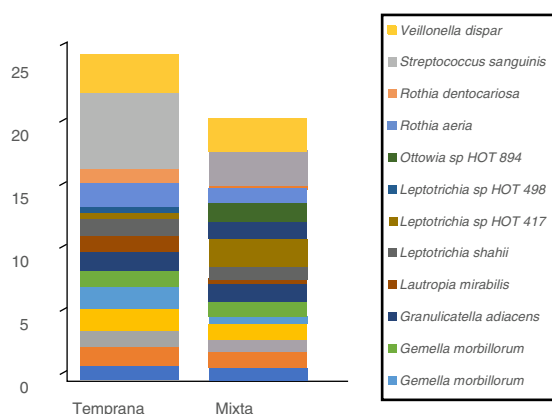
### Perfil bacteriano de biofilm oral según el tipo de dentición

El perfil bacteriano del biofilm oral varía tanto en presencia como en abundancia relativa en el género y en las especies bacterianas entre los 2 tipos de dentición. En los géneros bacterianos se observó que los que mayor abundancia relativa tiene en las muestras de biofilm procedentes de niños con dentición temporal fueron

**Tabla 2**  
Especies de microorganismos según dentición

Nombre organismo	D. temporal			D. mixta			p (R%)	p (P%)
	%P	R%	DE (%)	%P	R%	DE (%)		
<i>Abiotrophia defectiva</i>	100	1,171	2,448	100	1,093	2,486	0,775	1,000
<i>Actinobaculum sp. HOT 183</i>	93	1,486	3,762	93	1,202	4,202	0,137	1,000
<i>Actinomyces naeslundii</i>	100	1,247	3,055	100	0,853	1,470	0,713	1,000
<i>Gemella haemolysans</i>	100	1,807	1,960	100	1,417	1,864	0,744	1,000
<i>Gemella morbillorum</i>	100	1,689	2,148	100	0,591	0,949	0,033	1,000
<i>Gemella morbillorum</i>	93	1,359	1,330	100	1,134	3,097	0,085	0,775
<i>Granulicatella adiacens</i>	100	1,476	1,627	100	1,390	1,504	0,806	1,000
<i>Lautropia mirabilis</i>	100	1,147	3,178	100	0,389	0,462	0,902	1,000
<i>Leptotrichia shahii</i>	93	1,446	2,449	100	1,009	1,761	0,477	0,775
<i>Leptotrichia sp. HOT 417</i>	100	0,401	1,130	100	2,117	3,530	0,026	1,000
<i>Leptotrichia sp. HOT 498</i>	80	0,348	0,530	93	1,461	2,353	0,176	0,539
<i>Ottowia sp. HOT 894</i>	33	0,117	0,153	7	1,382	0,462	0,333	0,217
<i>Rothia aeria</i>	100	1,950	4,447	100	0,997	1,691	0,567	1,000
<i>Rothia dentocariosa</i>	93	1,136	2,277	100	0,347	0,342	0,652	0,775
<i>Streptococcus sanguinis</i>	100	5,920	5,214	100	2,753	3,034	0,045	1,000
<i>Veillonella dispar</i>	100	1,528	2,201	100	1,092	1,218	1,000	1,000

p<0,001. Prueba U de Mann-Whitney con corrección de Benjamini-Hochberg (tasa de descubrimientos falsos: 10%) de las comparaciones múltiples. Se muestran aquellas especies bacterianas con una proporción relativa promedio ≥1% en el microbioma de ambos grupos.



**Figura 1.** Perfil de especies bacterianas de biofilm oral según tipo de dentición. Se muestran las especies bacterianas con mayor abundancia relativa. El área de cada color corresponde a la abundancia relativa promedio (proporción relativa promedio) de cada especie bacteriana con relación al bacterioma del biofilm oral.

*Streptococcus* sonda 4, *Streptococcus* sonda 1, *Actinomyces* género sonda 3, *Veillonella* sonda 2, *Fusobacterium* sonda 4 y *Porphyromonas* género sonda 2. Mientras que en los niños con dentición mixta temprana se observan *Streptococcus* sonda 4, *Streptococcus* sonda 1, *Leptotrichia* sonda 3, *TM7* género, *Porphyromonas* género sonda 2, *Veillonella* género sonda 2 y *Neisseria* género sonda 2 (tabla 1).

En cuanto a las especies bacterianas, se observó que las 6 especies con mayor abundancia relativa en las muestras de biofilm procedentes de niños con dentición temporal fueron: *Streptococcus sanguinis*, *Rothia aeria*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, *Veillonella dispar* y *Actinobaculum sp. HOT 183*. Por su parte, en los niños con dentición mixta temprana se observó: *Streptococcus sanguinis*, *Leptotrichia sp. HOT 417*, *Leptotrichia sp. HOT 498*, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella adiacens* y *Ottowia sp. HOT 894* (tabla 2). En la figura 1 se muestran las especies bacterianas con mayor abundancia relativa.

En las muestras de biofilm oral analizadas se observó riqueza de especies bacterianas representada por el índice α de Shannon 2,89 (DE: 0,35). Esta riqueza microbiológica se mantuvo entre los grupos de estudio, sin mostrar diferencia estadísticamente significativa (p=0,06) (tabla 3, fig. 2).

**Tabla 3**  
Índice α de Shannon de diversidad microbiológica

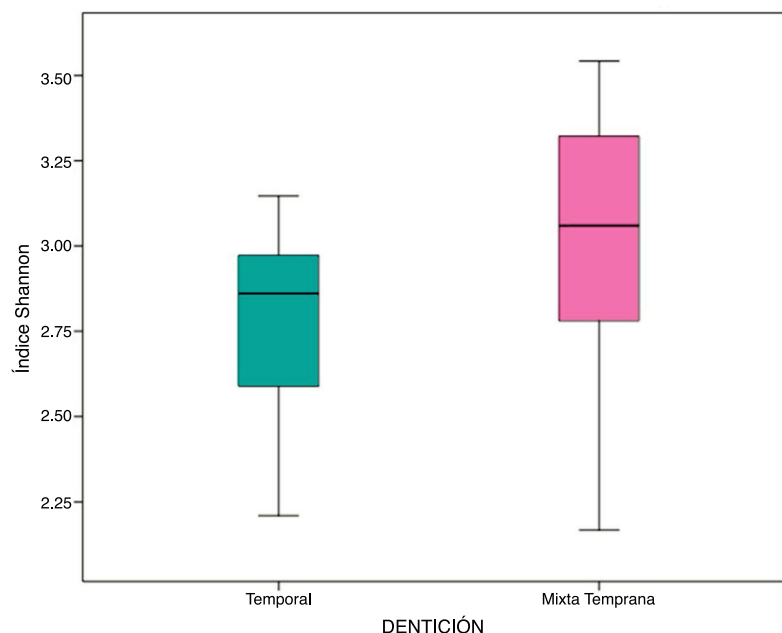
	General		D. temprana		D. mixta		p*
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Índice α de Shannon	2,89	0,35	2,77	0,27	3,01	0,40	0,06

\* t de Student.

**Discusión**

En los dientes encontramos una gran cantidad de bacterias que forman la biopelícula bacteriana. Algunas han sido implicadas en enfermedades bucales. Son importantes las investigaciones relacionadas con el conocimiento de la composición del bacterioma del biofilm supragingival: Kamma et al. investigaron la composición de la microbiota de la placa subgingival de los diferentes grupos de dientes en los niños con dentición mixta. En los resultados aseveraron que se identificaron grupos de microorganismos diferentes, tanto en dientes temporales como permanentes, y 45 especies microbianas diferentes fueron aisladas<sup>15</sup>. Xin et al. identificaron la diversidad microbiana oral de los niños sanos chinos. Tomaron muestras de la placa dental de 10 niños y en los resultados reportaron un total de 41 géneros y 112 especies bacterianas<sup>16</sup>. Shi et al. realizaron un estudio en el que investigaron los perfiles microbianos de la placa supragingival de dientes temporales y permanentes en niños sanos con dentición mixta y detectaron un total de 21 clases, 38 órdenes, 66 familias y 74 géneros<sup>17</sup>, lo que confirma la variedad microbiana entre los dientes temporales y permanentes. Esto coincide con el presente estudio, en el que se describió el perfil bacteriano del biofilm dental en niños con dentición temporal y mixta temprana: se encontraron 44 géneros y 360 especies bacterianas presentes en el biofilm oral analizado, lo que demuestra las diferencias considerables en la diversidad microbiana entre la dentición mixta y temporal. Dichas diferencias podrían relacionarse con factores físicos, químicos y ambientales.

Con relación al factor tiempo, Facal et al. estudiaron la topografía de las caries en los molares temporales y su relación con la edad cronológica. Afirmaron que la forma física de la corona de un diente temporal varía de la de un diente permanente: el temporal presenta una corona pequeña, con fosas y surcos poco profundos; el permanente, una corona de mayor tamaño, con fosas y surcos con más profundidad, lo que genera zonas de retención<sup>18</sup>. En el actual estudio, los dientes temporales tuvieron mayor



**Figura 2.** Índice de diversidad microbiológica  $\alpha$ -Shannon.

Se expresa el índice de Shannon en media y rango. No se observa diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

oportunidad para el desarrollo y la maduración del biofilm supragingival, ya que el tiempo de exposición al ambiente en la cavidad bucal es más extenso (6,5 años) que el de los dientes permanentes (5 años). El factor nutricional es importante para el ambiente de la cavidad oral: la dentición temporal ha pasado por sustancias químicas involucradas en la nutrición como la leche artificial y también con alimentos de consistencia semisólida y sólida; mientras que la dentición mixta no se le relaciona con leche artificial, pero sí con alimentos sólidos. Todos estos factores alimenticios podrían estar relacionados con la diversidad microbiológica encontrada.

Con respecto a los géneros bacterianos, Shi et al. estudiaron los perfiles microbianos del biofilm supragingival de dientes temporales y permanentes, y afirmaron que existen diferencias en la diversidad microbiana: de las muestras obtenidas, se encontraron diferencias en los dientes permanentes en el 25,2%; al compararlos con los dientes temporales, en un 20,9% y la diferencia en la comunidad microbiana a nivel de género se debió principalmente a *Actinomyces* para dentición permanente y a *Treponema* en dentición temporal<sup>17</sup>, lo que concuerda con el actual reporte, en el que se presentó diversidad microbiana en las muestras de estudio de dentición mixta temprana y temporal. Sin embargo, se discrepa respecto a la diferencia en la comunidad bacteriana a nivel de género, ya que los géneros bacterianos con mayor abundancia relativa que difieren de la comunidad microbiana en la dentición mixta temprana fueron *Leptotrichia* sonda 3, TM7 género y *Neisseria* género sonda 2, mientras que en dentición temporal fueron *Actinomyces* género sonda 3 y *Fusobacterium* sonda 4.

Xu et al. estudiaron el microbioma del biofilm bacteriano en niños con dentición temporal con caries y sin ella. Los géneros de mayor frecuencia presentes en el grupo de pacientes sin caries fueron *Leptotrichia*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas* *Neisseria* y *Veillonella*<sup>19</sup>; lo que coincide con el presente estudio en algunos géneros como *Streptococcus* sonda 4, *Streptococcus* sonda 1, *Actinomyces* sonda 3, *Veillonella* sonda 2 y *Porphyromonas* sonda 2 y discrepa con el género *Fusobacterium* sonda 4.

## Conclusión

Los géneros con mayor abundancia relativa en las muestras de biofilm procedentes de niños con dentición temporal fueron *Streptococcus* sonda 4, *Streptococcus* sonda 1, *Actinomyces* sonda 3, *Veillonella* sonda 2, *Fusobacterium* sonda 4 y *Porphyromonas* sonda 2; mientras que en los niños con dentición mixta temprana se observan *Streptococcus* sonda 4, *Streptococcus* sonda 1, *Leptotrichia* sonda 3, TM7 género, *Porphyromonas* sonda 2, *Veillonella* sonda 2 y *Neisseria* género. Respecto a las especies bacterianas, las de mayor abundancia relativa en las muestras de niños con dentición temporal fueron *Streptococcus sanguinis*, *Rothia aeria*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, *Veillonella dispar* y *Actinobaculum* sp. HOT 183. Por su parte, en los niños con dentición mixta temprana se encontraron *Streptococcus sanguinis*, *Leptotrichia* sp. HOT 417, *Leptotrichia* sp. HOT 498, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella adiacens* y *Ottowia* sp. HOT 894.

El perfil bacteriano del biofilm dental supragingival en niños con dentición temporal y mixta temprana muestra poca diversidad microbiológica tanto en presencia como en abundancia relativa y tanto a nivel de género como de especies bacterianas, sin mostrar resultados estadísticamente significativos.

## Recomendaciones

Se propone como recomendaciones para futuros estudios aumentar el tamaño de la muestra.

## Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por Colciencias (contrato 673-2014), código N.º141965741160, y ha sido ejecutado por la Corporación Universitaria Rafael Núñez.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias por la financiación de este proyecto con el contrato N.º 673 de 2014 y a los participantes por su incorporación al estudio.

## Bibliografía

- Gomez A, Nelson KE. The oral microbiome of children: Development, disease and implications beyond oral health. *Microb Ecol.* 2017;73:492–503.
- He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha).* 2015;60:69–80.
- Moon JH, Lee JH. Probing the diversity of healthy oral microbiome with bioinformatics approaches. *BMB Rep.* 2016;49:662–70.
- Belstrøm D, Paster BJ, Fiehn NE, Bardow B, Holmstrup P. Salivary bacterial fingerprints of established oral disease revealed by the Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing (HOMINGS) technique. *J Oral Microbiol.* 2016;8, <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v8.30170>
- Filoche S, Wong L, Sissons C. Critical reviews in oral biology and medicine: Oral Biofilms: Emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010;89:8–18.
- Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33:248–55.
- Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014;162 2 Pt A:22–38.
- Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017;23:276–86.
- Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell M, Burne RA, et al. The microbiome of site-specific dental plaque of children with different caries status. *Infect Immun.* 2017;85:e00106–117, 19.
- Belstrøm D, Holmstrup P, Bardow A, Kokaras A, Fiehn NE, Paster BJ. Temporal stability of the salivary microbiota in oral health. *PLoS One.* 2016;11, e0147472.
- Peñaloza Quintero R, Palacio Basto Y, Gómez Serrano L, Becerra Garnica A, Amaya Lara J, Suárez Zúñiga E, et al. IV Estudio nacional de salud bucal – ENSAB IV. 2016, <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/default.aspx>.
- Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn NE, Kirkby N, Kokaras A, Paster BJ, et al. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *J Oral Microbiol.* 2017;9:1270614.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 2003;34:374–8.
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* 2006;411:134–93.
- Kamma JJ, Diamanti-Kipiotti A, Nakou M, Mitsis FJ. Profile of subgingival microbiota in children with mixed dentition. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:103–11.
- Xin BC, Luo AH, Qin J, Paster BJ, Xu YL, Li YL, et al. Microbial diversity in the oral cavity of healthy Chinese Han children. *Oral Dis.* 2013;19:401–5.
- Shi W, Qin M, Chen F, Xia B. Supragingival microbial profiles of permanent and deciduous teeth in children with mixed dentition. *PLoS One.* 2016 11;11, e0146938.
- Facal García M, Blanco Rivas A, Sieira Fernández C, Alonso Alonso I. Topografía de las caries en los molares temporales y su relación con la edad cronológica. *Odontol Pediátr.* 2002;10:111–5.
- Xu H, Hao W, Zhou Q, Wang W, Xia Z, Liu C, et al. Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. *PLoS One.* 2014;9:e89269, 28.