

2022

LO. ERB. Verónica
Morales Dorantes

ESTREPTOCOCOS ORALES Y SU POSIBLE ROL COMO RESERVORIOS
DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

Tesis

**ESTREPTOCOCOS ORALES Y SU POSIBLE ROL COMO
RESERVORIOS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

Que como parte de los requisitos para obtener
el Grado de

Maestría en Ciencias en Biomedicina

Presenta

LO. ERB. Verónica Morales Dorantes

Dirigido por:

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Querétaro, Qro. enero 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Biomedicina

**ESTREPTOCOCOS ORALES Y SU POSIBLE ROL COMO RESERVORIOS DE
GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestría en Ciencias en Biomedicina

Presenta

LO. ERB. Verónica Morales Dorantes

Dirigido por:

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez
Presidente

Firma

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Secretario

Firma

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Vocal

Firma

Dr. Pablo García Solís
Suplente

Firma

Dr. José Luis Ayala Herrera
Suplente

Firma

DEDICATORIAS

A Dios

Por permitirme continuar con mi formación profesional.

A mi madre

Quien está siempre a mi lado, apoyándome en todas las actividades que llevo a cabo.

A mi padre

Con sus sabios consejos hace que todas mis metas se hagan realidad.

A mis hermanos

A José por darme su ejemplo como hombre responsable de todos sus proyectos, a Melissa por ser tan persistente en todo lo que se propone y a Estefanía por asesorarme en cuanto a tecnología se refiere.

A mis sobrinos José Santiago y Luis Ángel

Para que vean en mi un ejemplo a seguir, que pueden cumplir todo lo que se fijan de meta, los sueños son reales si todos los días trabajamos un poco para alcanzarlos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez

Por el constante entusiasmo que contagia para hacer investigación, sin duda el mejor director de tesis, siempre atento al proyecto sin descuidar los miles de proyectos más que está a cargo; jamás encontraré la manera de agradecerle todo su apoyo para lograr concluir este trabajo de investigación.

A la Dra. Rosita Pérez Serrano

Por su tiempo para las revisiones constantes en la escritura de este proyecto y por sus aportaciones para desarrollar el mismo.

A CONACYT

Por los recursos otorgados para llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

INDICE

I. ANTECEDENTES	11
Planteamiento del Problema	21
Justificación	22
II. HIPÓTESIS	23
III. OBJETIVOS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
IV. METODOLOGÍA	25
4.1 Identificación por PCR de las cinco especies de estreptococos orales en cada una de las muestras, así como identificación de los nueve genes de resistencia a antibióticos.....	25
4.1.1 Obtención de la placa dentobacteriana.....	25
4.1.2 Aislamiento del ADN de la muestra de placa dentobacteriana total.....	27
4.1.3 Identificación de la posible presencia de cinco especies de estreptococos orales en la placa dentobacteriana total por PCR.	27
4.1.4 Identificación por PCR de la presencia o ausencia de nueve genes de resistencia a antibióticos en cada una de las muestras de cada uno de los pacientes.....	30
4.2 Identificación por PCR de las UFCs de estreptococos cultivados y aislados de cada uno de los participantes seleccionados.....	32
4.2.1 Preparación de medio de cultivo Tripticasa soya-extracto de levadura-Sucrosa-Bacitracina Agar (<i>TYS20B</i>).	33
4.2.2 Aislamiento e identificación de las UFCs de los estreptococos orales.	34
4.2.3 Identificación por PCR de las especies de estreptococos orales aislados de cada uno de los participantes.....	34
4.2.4 Aislamiento del ADN de las colonias aisladas.....	36
4.2.5 Identificación de la especie de estreptococo aislado.....	36
4.3. Identificación por PCR de la presencia o ausencia de nueve genes de resistencia a antibióticos en cada una de las especies de estreptococos orales aislados de cada uno de los participantes seleccionados.....	37
Desechos.....	38
V.RESULTADOS.....	39
VI. DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIÓN.....	49
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	50
VIII. ANEXOS.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para identificar estreptococos orales....	28
Tabla 2. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la detección de los 9 genes de resistencia a antibióticos.....	31
Tabla 3. Características de los pacientes incluidos.....	39
Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de las cinco especies de estreptococos en los 63 sujetos incluidos.....	39
Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de especies de estreptococos en la población muestreada.....	40
Tabla 6. Frecuencia y porcentaje de los nueve genes de resistencia de interés en la placa dental total de la población incluida.....	40
Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de genes de resistencia a antibióticos en la población...	41
Tabla 8. Número de cepas seleccionadas e identificadas.....	42
Tabla 9. Frecuencia y porcentaje en la que se encuentran los genes de resistencia a antibióticos en las 22 cepas procedentes de sujetos con cinco o seis genes de resistencia a antibióticos en su placa dental.....	42
Tabla 10. Frecuencia y porcentaje en la que se encuentran diferente número de genes de resistencia a antibióticos en las 22 cepas obtenidas de sujetos con cinco o seis genes de resistencia a antibióticos en su placa dentobacteriana.....	43
Tabla 11. Genes de resistencia a antibióticos de los que pueden o no ser reservorios frecuentes las especies de interés.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incubación de las muestras.	26
Figura 2. Termociclador	28
Figura 3. Electroforesis.....	29
Figura 4. Gel teñido.	29
Figura 5. Transiluminador UV.	29
Figura 6. Visualización de gel de agarosa.	30
Figura 7. Termociclador.	31
Figura 8. Electroforesis de genes de resistencia a antibióticos.....	32
Figura 9. Preparación del agar <i>TYS20B</i>	33
Figura 10. Incubación bajo anaerobiosis.	34
Figura 11. Observación y elección de colonias en estereomicroscopio.	35
Figura 12. Caja de cultivo de estreptococos orales.	35

ABREVIATURAS Y SIGLAS

SPE	Sustancias Poliméricas Extracelulares
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. gordonii</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
CPOD	Dientes Cariados Perdidos Obturados
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
EGM	Elementos Genéticos Móviles
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
SPE	Sustancias Poliméricas Extracelulares
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

La resistencia a antibióticos es un problema a nivel mundial, cada día se reconocen más bacterias resistentes a antibióticos, obstaculizando los tratamientos convencionales y, por tanto, poniendo en peligro la salud del paciente. En la cavidad oral, los estreptococos representan el género más frecuente y están relacionados ampliamente con la etiología de la caries dental, sin embargo, no se sabe si las especies más comunes de este género son reservorios frecuentes de resistencia a antibióticos cuando están presentes en la placa dentobacteriana. **Objetivo:** Determinar si los estreptococos orales son un reservorio frecuente de genes de resistencia a antibióticos de uso común en el humano. **Metodología:** Se realizó un estudio experimental *in vitro* con muestras de placa dentobacteriana de sujetos con caries dental, se identificaron cinco especies de estreptococos orales y nueve genes de resistencia a antibióticos que estos portaban. **Resultados:** Se revisaron 120 sujetos, se llevó a cabo la identificación de estreptococos orales y genes de resistencia a antibióticos en las muestras de la placa dentobacteriana de 63 sujetos que cumplieron los criterios de selección, se cultivaron, aislaron e identificaron 33 colonias, en ellas se encontraron frecuentemente diversos genes de resistencia a antibióticos. **Conclusión:** Debido a las limitaciones de este estudio y bajo la propuesta para determinar cuándo una especie bacteriana es reservorio frecuente de genes de resistencia a antibióticos, sólo el *S. sanguis* puede ser considerado reservorio frecuente de los genes *tetM* y *blaTEM*.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a worldwide problem, every day more antibiotic-resistant bacteria are recognized, hindering conventional antibiotic treatments and therefore jeopardize the health of the patient. In the oral cavity, streptococci represent the most frequent genus and are widely related to the etiology of dental caries; however, it is not known whether the most common species of this genus are frequent reservoirs of antibiotic resistance when present in the dentobacterial plaque. **Objective:** To determine whether oral streptococci are a frequent reservoir of antibiotic resistance genes commonly used in humans. **Methodology:** An experimental *in vitro* study was carried out with samples of dentobacterial plaque from subjects with dental caries, five species of oral streptococci, and nine antibiotic resistance genes that they carried were identified. **Results:** 120 subjects were screened, the identification of oral streptococci and antibiotic resistance genes was carried out in the dentobacterial plaque samples of 63 subjects who met the selection criteria, 33 colonies were cultured, isolated, and identified, and several antibiotic resistance genes were frequently found in them. **Conclusion:** So far, with the limitations of this study and under the proposal to determine when a bacterial species is a frequent reservoir of antibiotic resistance genes, only *Streptococcus sanguinis* can be considered a frequent reservoir of *tetM* and *blaTEM* genes.

I. ANTECEDENTES

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial (Koukos *et al.* 2016). Es un fenómeno complejo, que involucra diversos factores, tales como el uso inapropiado (Gyssens 2011; Pallasch 2000) y abuso de antibióticos, programas débiles de control de infecciones y la existencia de pacientes con múltiples enfermedades. La principal consecuencia de la resistencia a los antibióticos es el fracaso del tratamiento, el aumento en la morbilidad y mortalidad, así como el incremento en los costos de la asistencia médica (García 2003), poniendo en peligro no sólo la terapia antibiótica para infecciones orales, sino también para las infecciones extraorales causadas por la translocación de bacterias de la cavidad oral hacia el torrente sanguíneo y en cualquier parte del cuerpo (Almeida 2020).

La resistencia antibiótica es un fenómeno biológico natural, cada vez que se pone en uso un nuevo agente antibiótico en la clínica, se detectan a la par en el laboratorio cepas resistentes a este, es decir, cepas que son capaces de multiplicarse aun en presencia de concentraciones mayores a las dosis terapéuticas (García 2003).

La función de los antibióticos en el medio ambiente natural (no clínico) no ha recibido suficiente atención. La mayoría de los antibióticos utilizados para tratar infecciones son producidos por microorganismos del medio ambiente, lo que significa que los genes de resistencia a antibióticos deben haber surgido en hábitats no clínicos (Mead 1977).

En general, los mecanismos de resistencia a antibióticos pre-existen o se modifican en la naturaleza debido a mutaciones o transferencia de genes, que pueden ser localizados en el cromosoma bacteriano o en los plásmidos (García 2003).

La elevada exposición de las bacterias a los antibióticos de amplio espectro ha producido las condiciones ideales para conferir resistencia a estos antibióticos. De acuerdo con la literatura la resistencia a los antibióticos puede ser debido a 5 mecanismos clave:

- 1) Resistencia intrínseca
- 2) Inactivación enzimática
- 3) Resistencia mutacional
- 4) Presencia de bombas de salida
- 5) Adquisición horizontal

1) **Resistencia intrínseca**, se refiere a la resistencia inherente, la que ocurre de manera natural y que puede ser considerada una característica de especies. Puede ser debido a la falta de enzimas necesarias para convertir el antibiótico en sus metabolitos activos (Walker 1996) o también puede deberse a una concentración inadecuada de antibiótico (Taraszkievicz *et al.* 2013).

2) **Inactivación enzimática**, las bacterias producen enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad, las más prevalentes son las β -lactamasas para las penicilinas, estas proteínas son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia (Poole 2004).

3) **Resistencia mutacional**, en esta, las células pueden convertirse en resistentes debido a una mutación, afectando el antibiótico de interés (Kanwar, Sah, and Suresh 2017). Las mutaciones espontáneas ocurren muy raramente, a una tasa de 10^{-6} a 10^{-10} por generación y frecuentemente no están relacionadas con la sobrevivencia de los organismos. Una mutación resulta del cambio de una sola base de un nucleótido en el ADN de un organismo que puede resultar en resistencia a cierto antibiótico. Esta resistencia es debido al cambio de un aminoácido en una proteína asociada a la permeabilidad de la membrana en la célula bacteriana (Walker 1996).

4) **Presencia de bombas de salida**, estas bombas, transportan moléculas de antibiótico fuera de la célula bacteriana (Ian and Marilyn 2001). Estas bombas de salida o expulsión son proteínas integrales de membrana que utilizan energía metabólica para expulsar el antibiótico a través de la membrana contra el gradiente de concentración, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción (Kouidhi, Al Qurashi, and Chaieb 2015).

5) La **transferencia horizontal** de información genética, es un mecanismo imprescindible para la adquisición de nuevos rasgos genéticos y esto constituye una vía importante para la expansión de información genética entre bacterias, esta información permitirá adaptación y maximización de oportunidades dentro de un nicho particular (Roberts 2014). La transferencia horizontal ha surgido a través de las interacciones entre comunidades bacterianas, con el fin de adquirir rasgos para hacer frente a las bacterias transitorias que intentan perturbar su medio ambiente (Roberts 1999).

Un ejemplo de la transferencia horizontal es la liberación de múltiples mecanismos de defensa entre bacterias que se comparten unas a otras para hacer frente a agresiones del

medio oral, entre ellos la producción de enzimas: lactoperoxidasa, lisozima, bacteriocinas, así como la producción de inmunoglobulinas (A, G y M), y el constante recambio de células epiteliales (Wilson 2005).

El incremento en la evidencia de la transferencia horizontal de genes en la cavidad oral humana muestra que este proceso es indispensable para la adaptabilidad de la comunidad oral. La transferencia horizontal es una estrategia mucho más compleja que una simple adquisición de ADN. En bacterias orales, si estas requieren de un gen en específico, por ejemplo, algunos genes de resistencia a antibiótico, es posible que ya presenten el mecanismo de resistencia y sólo requiera la adquisición del gen necesario mediante varios mecanismos de transferencia horizontal (Roberts 2014).

Una bacteria puede adquirir nuevo ADN por **transferencia horizontal** mediante transformación, transducción o conjugación (Roberts *et al.* 1999; Warburton *et al.* 2007).

La **transformación** es el proceso por el cual una bacteria adquiere segmentos de ADN libre de su medio ambiente que le rodea y lo incorpora dentro de su genoma. La fuente de la transformación es usualmente de ADN de células bacterianas lisadas. Es frecuente hacer que suceda en el laboratorio al insertar ADN de un organismo a otro (Roberts and Mullany 2010), pero en cavidad oral la generación de ADN en el biofilm oral por transformación de bacterias competentes no es bien entendida, aunque se ha revelado que entre los estreptococos cariogénicos, el *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) libera ADN extracelular mediante vesículas membranosas dentro de la formación del biofilm dental y, por tanto, provee una fuente de material genético para otras especies dentro del mismo (Liao 2014).

Por otro lado, la **transducción** es el proceso por el cual el ADN bacteriano se empaqueta erróneamente en las cabezas de los bacteriófagos, cuando el fago infecta a otra célula bacteriana el ADN empaquetado es incorporado dentro del genoma del hospedador (Krishnakumar, Kuzhimattam, and Kumar 2015). En cavidad oral no se han reportado observaciones de transducción, hay evidencia que los bacteriófagos son abundantes en la cavidad oral, pero no que son capaces de transferir información genética (Roberts 2014).

El mecanismo más común de transferencia de genes de resistencia a antibióticos es por **conjugación**. Este proceso requiere el contacto célula-célula y a través de un pili e

involucra la transferencia del plásmido o transposón de ADN de una bacteria donadora a la bacteria aceptora. Los plásmidos son pequeños elementos extracromosomales que pueden ser fácilmente intercambiados entre bacterias de la misma especie o incluso entre bacterias de diferente especie (Krishnakumar, Kuzhimattam, and Kumar 2015). En general, los mecanismos de resistencia a antibióticos preexisten o se modifican en la naturaleza, pueden ser localizados en el cromosoma bacteriano o en los plásmidos (García 2003).

La transferencia horizontal de genes puede contribuir a la sobrevivencia bajo presión antibiótica, esto es, cuando la bacteria adquiere proteínas de resistencia antibiótica. Es importante recalcar que no sólo por medio de pilis se da lugar a la transferencia horizontal de genes de resistencia, también es posible a través de **transposones conjugativos** vía poro de apareamiento, estos transposones son elementos móviles que se integran en el genoma de su anfitrión. Ellos codifican toda la información necesaria para la transposición intracelular y la conjugación intercelular. Los transposones conjugativos pueden llevar genes accesorios, los cuales frecuentemente codifican para resistencia a más antibióticos (Roberts and Mullany 2010) y son clasificados como elementos genéticos móviles (EGM). El oligonucleótido EGM es el transposón Tn916, siendo el principal responsable de la transferencia de una multitud de resistencia a antibióticos en la cavidad oral. Tn916 normalmente confiere resistencia a tetraciclina y minociclina por codificación de la proteína *tetM*, una proteína de protección ribosomal la cual se une de manera reversible a la subunidad 23S del ARN ribosomal, previniendo la unión de la tetraciclina y, por tanto, impidiendo la síntesis de proteínas o en su defecto, removiendo la molécula de tetraciclina (Roberts 2014).

Los genes de resistencia a la tetraciclina se han encontrado justamente en los transposones conjugativos (Lancaster *et al.* 2005). De los 29 genes identificados relacionados con tetraciclinas (Ian and Marilyn 2001), el gen de resistencia más común es el *tetM* presente en el transposón conjugativo Tn916, capaz de ser transferido de una cepa comensal a un patógeno endodóntico, por ejemplo (Moon, Kim, and Cha 2011).

Las tetraciclinas fueron descubiertas en la década de 1940, son una familia de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas al impedir la unión del aminoacil-ARNt al sitio A de la subunidad menor del ribosoma. Son agentes de amplio espectro, exhiben actividad contra bacterias gram positivas, gram negativas, así como para otros organismos, tales como la clamidia, micoplasma, rickettsia y parásitos protozoarios. Las

propiedades antimicrobianas favorables y la ausencia de efectos secundarios adversos importantes han llevado al uso extenso de las tetraciclinas en infecciones humanas y animales (Ian and Marilyn 2001).

Las proteínas de eflujo son las más estudiadas de las proteínas *tet*. Los genes *tet* codifican para proteínas asociadas a la membrana que exportan tetraciclina de la célula. La exportación reduce la concentración del fármaco intracelular y por lo tanto protege a los ribosomas dentro de la célula. Estos genes se encuentran tanto en gram positivos como en gram negativos (Ian and Marilyn 2001).

Los genes de resistencia para la tetraciclina que se han mencionado con mayor frecuencia son los genes *tetM*, *tetQ*, *tetW* en saliva (Seville *et al.* 2009), en biofilm subgingival (Lancaster *et al.* 2005) y en infecciones endodónticas (Jungermann *et al.* 2011; Rôças and Siqueira Jr 2012; Lins *et al.* 2013; Rôças and Siqueira Jr 2013). Aproximadamente la mitad de las cepas aisladas resistentes a tetraciclina son también resistentes a la β -lactámicos, debido a que los genes que codifican resistencia a ambos antibióticos pueden ser transferidos juntos (Walker 1996).

Los antibióticos β -lactámicos son los más populares, usados con frecuencia en el tratamiento de una gran variedad de infecciones por bacterias gram positivas y gram negativas (John 2004). Estos agentes representan >65% de los antibióticos utilizados en el mundo, con más del 50% de los fármacos comercializados en los cuales se incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenem, y más recientemente mezclas de penicilina con cefalosporina (Dalhoff and Thomson 2003). Estos antibióticos son caracterizados por tener 4 anillos β -lactámicos, sitios específicos para las enzimas bacterianas de la pared celular o también llamadas proteínas de unión a penicilina (Siu 2002; Essack 2001).

La resistencia a estos puede ocurrir debido a la disminución de la permeabilidad de la célula bacteriana al antibiótico, alteración de la penicilina unida a proteínas o la producción de una enzima inactivadora: una β -lactamasa (Walker 1996).

La presencia de genes asociados con la resistencia a los β -lactámicos ha sido evaluada en el medio ambiente oral. De acuerdo a la literatura los genes encontrados con mayor frecuencia son *cfxA/cfxA2* y el gen *blaTEM* en muestras de conductos radiculares (Jungermann *et al.* 2011; Rôças and Siqueira Jr 2012; 2013) y los genes *pbp1a*, *pbp2x* y *pbp2b* que se han encontrado en muestras de saliva (Nakayama *et al.* 2006).

Finalmente, el tercer grupo de antibióticos más utilizados es la eritromicina, la cual tiene como modo de acción interferir con la síntesis de proteínas mediante la disociación del peptidil ARNt de los ribosomas bacterianos durante el proceso de translocación. La resistencia a este macrólido en las bacterias gram positivas puede ocurrir debido a una mutación que resulta en disminución de la afinidad ribosomal para el antibiótico. Esta resistencia está mediada por la alteración del sitio de unión de la eritromicina al ribosoma por metilación de residuos de adenina de una enzima codificada por el gen *erm*, que induce un cambio conformacional que impide la unión al sitio de unión ribosomal (subunidad 23S), tanto de macrólidos, como de lincosamidas y estreptograminas B. La resistencia también puede ser adquirida mediante material genético exógeno que puede localizarse en un plásmido o transposón que codifica resistencia por el mismo mecanismo (Walker 1996).

Del total de la microbiota cultivable analizada para la resistencia a la eritromicina dos genes de resistencia han sido los más comúnmente encontrados: gen *mef* y *ermB* (Roberts and Mullany 2010). El gen *ermC* ha sido detectado en muestras en infecciones endodónticas. Tanto *ermA* y *ermB* no han sido identificados en muestras de conducto radicular, mientras que el gen *ermB* ha sido encontrado en saliva con alta frecuencia (Seville *et al.* 2009; Jungermann *et al.* 2011; Rôças and Siqueira Jr 2012; 2013) .

Este intercambio genético es un fenómeno biológico natural entre las bacterias que guía a la propagación, por ejemplo, de genes de resistencia a antibióticos entre los habitantes del biofilm dental. La formación de biofilm casi siempre da lugar al incremento en la resistencia a antibióticos (amoxicilina, doxiciclina, metronidazol) en primer lugar al restringir la penetración del mismo (Melo and Perussi 2013; Marsh 2009) y en segundo lugar por la transferencia de genes entre géneros y/o especies que codifican resistencia (Lancaster *et al.* 2005) .

En el biofilm dental la composición en adultos sanos es generalmente estable, encontrando como género predominante a los estreptococos (Kumar 2013). Se ha identificado que en los pacientes sanos se obtiene una comunidad más diversa de microorganismos comparado con aquellos pacientes con enfermedad periodontal donde la diversidad de la microbiota se ve disminuida (Almeida 2020).

El primer científico que describió la presencia de bacterias adheridas a las superficies dentales fue Van Leeuwenhoek en el siglo XVII, al utilizar su microscopio de luz

(Barceló *et al.* 2016), a partir de ese momento mucho se ha reportado acerca de la microbiota de la cavidad oral. Actualmente se sabe que es muy diversa, más de 700 especies bacterianas han sido detectadas (Paster *et al.* 2005). Estas bacterias juegan un rol importante en el mantenimiento de la salud oral y en la etiología de enfermedades orales en humanos (Socransky, Smith, and Haffajee 2002; Kumar *et al.* 2005).

La formación del biofilm oral comienza en el mismo instante que comienza la erupción dental, la superficie de los dientes es cubierta por la película adquirida, se ha documentado que este proceso puede tomar minutos (Hannig 1999). La película adquirida está compuesta por diversas moléculas, entre ellas, proteínas que actúan como receptores que son reconocidos por diversas bacterias (Hannig, Hannig, and Attin 2005; Siqueira *et al.* 2010). Aquellas bacterias que pueden reconocer esos receptores y que se unen a la película adquirida de la superficie de los dientes se conocen como colonizadores tempranos (Roberts and Mullany 2010).

La principal proteína que actúa como receptor es la α -amilasa, presente en grandes cantidades en la saliva. Se han identificado como los primeros colonizadores a los *Streptococcus spp.*, debido a que tienen la habilidad de unirse a esta proteína de unión de la saliva (Kolenbrander *et al.* 2002). A medida que las bacterias se unen, crecen y se dividen, comienzan a expresar el fenotipo de biofilm (Stephens 2002).

Cuando se expresan en biofilm, las bacterias secretan sustancias poliméricas extracelulares (SPE), que incluye polipéptidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, además de incorporar agua en su estructura, ésta matriz física (agua, microorganismos y SPE) proporciona estabilidad a las células y microcolonias (Gibbons 1989) a las fuerzas de cizallamiento experimentadas en la cavidad oral (Post *et al.* 2007).

Se calcula que un milímetro cúbico de biofilm dental contiene alrededor de 100 millones de bacterias (Jenkinson and Lamont 2005; Chung *et al.* 2016). Los biofilms bacterianos representan una estrategia antigua de supervivencia procariota esto debido a que las bacterias logran ventajas significativas, pues les proporcionan protección frente a las fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, al igual que les proporciona nutrientes de manera concentrada, y facilitan la eliminación de sus desechos (Post *et al.* 2007).

Los biofilms dentales son encontrados en salud y ciertas bacterias comensales tienen el potencial de excluir patógenos, con el fin de no competir por los nutrientes y sitios de

unión (Van Hoogmoed *et al.* 2008). Cuando ocurre acumulación de biofilm dental, éste es acompañado de cambios en la composición bacteriana, guiando el inicio de la enfermedad dental, tal como caries, gingivitis, y periodontitis (Baehni and Takeuchi 2003).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha definido a la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, comenzando con el reblandecimiento del tejido duro del diente y evolucionando hasta la formación de una cavidad. Si no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida de los individuos (Godínez Morales and Luengas Quintero 2009).

Se ha considerado al *S. mutans* como el principal agente etiológico bacteriano de la caries dental (Maheswari *et al.* 2015; Hamada and Slade 1980; Loesche 1986). *S. mutans* es uno de los colonizadores primarios así como otros estreptococos del grupo viridans como son: *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius* y *S. gordonii*, estos colonizadores primarios son ubicuos, constituyen el 80% (Nyvad and Fejerskov 1987) de la microbiota total cultivable (Nyvad and Kilian 1990), presentes principalmente en el biofilm dental (Axelsson 2000; Li and Tanner 1998).

La adherencia de *S. mutans* a las superficies dentales es el primer paso en la formación de los biofilms (Cvitkovitch, Li, and Ellen 2003; Ohta *et al.* 2017). *S. mutans*, es acidúrico y acidogénico, expresa una gran variedad de adhesinas de superficie (Jenkinson and Demuth 1997) que pueden unirse a la α -amilasa de la película adquirida salival en los dientes (Mitchell 2003) y provee también un sitio para la adhesión inicial para otros microorganismos (Kishimoto, Hay, and Gibbons 1989). Esta bacteria sintetiza grandes cantidades de glucanos extracelulares y fructanos a partir de sucrosa usando glucosiltransferasas y fructosiltransferasas. Estos glucanos proveen de sitios específicos de unión para la colonización bacteriana en la superficie de los dientes y da la integridad estructural de la matriz extracelular (Bowen 2002).

Además de *S. mutans* también se ha identificado la presencia de *S. gordonii* como colonizador primario en los biofilm dentales, se ha documentado que interactúa con la α -amilasa salival, lo cual sugiere que contribuye a la unión de *S. gordonii* a la superficie dental (Rogers *et al.* 2001). Se ha revelado la existencia de un antagonismo con *S. gordonii* teniendo un interesante mecanismo de liberación de ADN. Las bases

moleculares de este antagonismo son dependientes de la producción de bacteriocinas (Kreth, 2005).

Las bacteriocinas son proteínas antimicrobianas que inhiben la competencia de otras especies bacterianas, *S. mutans* produce una cantidad enorme de bacteriocinas, reguladas por un sistema de competencia, es decir, se da la liberación de una proteína ComE reguladora transcripcional que se encuentra en la secuencia promotora de muchas bacteriocinas para activar la cascada de competencias y dar lugar a la activación de la transcripción y también activa los genes responsables para el consumo de ADN. Experimentos *in vitro* con *S. mutans* y *S. gordonii* han confirmado la inducción del sistema de competencia, donde *S. mutans* da lugar a la liberación de bacteriocinas para la destrucción de *S. gordonii*, el cual libera su ADN que queda libre y *S. mutans* lo captura para su transformación, adquiriendo así nuevos rasgos genéticos (Kreth 2006).

Mientras que *S. mutans* ataca a *S. gordonii*, también existe un mecanismo por el cual *S. gordonii* junto con *S. sanguis* puede inhibir a *S. mutans*, y esto es a través de la producción de peróxido de hidrógeno para el cual *S. mutans* es sumamente susceptible (Kreth 2008).

Interesantemente la producción de peróxido de hidrógeno está íntimamente correlacionada con la liberación de ADN. La enzima responsable de la producción de peróxido de hidrógeno en estas dos especies se ha identificado como piruvato oxidasa, una enzima oxido-reductasa que cataliza la conversión de piruvato, fosfato inorgánico y oxígeno molecular para dar lugar al peróxido de hidrógeno en un medio aeróbico. Además, se ha revelado que esta enzima piruvato oxidasa también la presentan *S. oralis* y *S. mitis*; constituyentes importantes del biofilm dental (Zhu 2014).

En condiciones anaeróbicas, la producción de peróxido de hidrógeno se ve disminuida, con una reducción significativa de la concentración extracelular de ADN (Itzek 2011).

Mientras que existen constantes fluctuaciones de alimentos y bebidas, la principal fuente de nutrientes de las bacterias orales es la saliva, también lo es la alimentación, existen diversos carbohidratos que pueden ser utilizados rápidamente y proveen ventaja para algunos microorganismos, en cambio, otras especies requieren de los productos elaborados por otras bacterias para su nutrición, tal es el caso de *Veillonella* que consume el lactato producido por los estreptococos cariogénicos toda vez que metabolizan los azúcares simples de la dieta (Roberts 2014).

Por su parte, *S. sanguis* es otra de las primeras bacterias que se adhiere selectivamente y coloniza los dientes cubiertos de saliva. Esta especie aparece generalmente en la cavidad humana después de la erupción dental y se convierte en un habitante normal de la boca (Gong, Mailloux, and Herzberg 2000).

Específicamente *S. sanguis*, se ha asociado a sitios de los dientes libres de enfermedad, es decir, estaría compitiendo por la colonización de la superficie de los dientes desde del momento de la erupción con otros estreptococos potencialmente cariogénicos como el *S. mutans*. *S. sanguis* se ha propuesto como un microorganismo protector en los dientes de sujetos adultos jóvenes ya que se ha reportado que al tener una mayor presencia de *S. sanguis* presentan bajo riesgo de desarrollar lesiones cariosas en la superficie de los dientes (Giacaman 2012).

Mientras que *S. oralis* se relaciona con la sobrevivencia y persistencia de los demás estreptococos, al metabolizar glucoproteínas del hospedador para dar lugar a la liberación de monosacáridos (Byers *et al.* 1999). Por otra parte, a *S. mitis* se reconoce por causar bacteriemia o endocarditis infecciosa relacionado a tratamiento dental (Sabella, Murphy, and Drummond-Webb 2001).

Diferencias en las proporciones relativas de otras especies de estreptococos han sido identificadas entre la microbiota temprana en caries activa e individuos libres de caries. Específicamente la proporción de *S. mitis* es mayor que la proporción de *S. sanguis* en individuos con caries activa (De Soet, Nyvad, and Kilian 2000).

Por otro lado, para que se dé lugar a la maduración del biofilm se requiere de la unión de otras bacterias a las previamente unidas al diente, secuencialmente aparece una superficie naciente que forma el puente con otras células bacterianas co-agregadas. La co-agregación es uno de los mecanismos más importantes subyacentes a la colonización bacteriana y formación del biofilm dental al servir como puente entre colonizadores (Kolenbrander *et al.* 2002). La co-agregación entre bacterias orales se cree que contribuye no sólo a la colonización a través de mecanismos físico-químicos, también a la comunicación metabólica e intercambio genético debido a que cada bacteria puede fácilmente acceder a la célula bacteriana vecina y sus metabolitos (Hojo *et al.* 2009). Este intercambio genético es clave si de genes de resistencia a antibióticos se trata.

Planteamiento del Problema

La resistencia a antibióticos se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial, comprometiendo la eficacia de los mismos para las infecciones humanas.

Es razonable suponer que en cavidad oral, en donde existe una gran diversidad microbiana y diversos nichos en donde alojarse, existe un gran potencial de transferencia de genes de resistencia a antibióticos, y que las comunidades de bacterias cariogénicas, que son comensales comunes y constantes en el humano, pudieran estar actuando como reservorios de genes de resistencia, lo que podría estar ocasionando que otros microorganismos comensales y/o patógenos adquieran esa misma resistencia, generando así graves problemas a la salud del paciente.

Justificación

A pesar de que se han identificado diversos genes de resistencia a antibióticos en distintos nichos de la cavidad oral (conducto radicular, saliva, fluido crevicular) esta identificación se ha realizado en condiciones de enfermedad, en comunidades microbianas en desequilibrio, y hasta el momento no se ha investigado la posibilidad de que los estreptococos orales sean reservorios frecuentes de genes de resistencia a antibióticos.

El que se determine si son reservorios frecuentes es fundamental en el estudio de la resistencia a antibióticos, pues implica que un grupo de microorganismos que es constante y común en los seres humanos podría ser capaz de almacenar y transmitir información genética a otros microorganismos que estén de paso por la cavidad oral y que tengan potencial patogénico en otras partes del cuerpo.

Este proyecto pretende, además, revalorar a la subestimada “caries” y su atención. Pues muestra que los microorganismos capaces de causarla también tendrían que ser considerados como reservorios frecuentes de genes de resistencia a antibióticos y por lo tanto la eliminación o al menos el control de estos microorganismos tendría que ser más efectiva, y la atención odontológica no sólo en función de prevenir y contrarrestar enfermedades dentales, sino también prevenir la resistencia a antibióticos y, por lo tanto, impactar en la salud general del individuo y de la comunidad en general.

II. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

Los estreptococos orales frecuentemente presentan genes de resistencia a antibióticos cuando están presentes en la microbiota de la placa dentobacteriana.

Hipótesis nula

Los estreptococos orales no presentan frecuentemente genes de resistencia a antibióticos cuando están presentes en la microbiota de la placa dentobacteriana.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los estreptococos orales presentan frecuentemente genes de resistencia a antibióticos cuando están presentes en la microbiota de placa dentobacteriana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar por PCR la presencia o ausencia de cinco especies de estreptococos orales (*S. oralis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* y *S. gordonii*) y nueve genes de resistencia a antibióticos (*blaTEM*, *cfxA*, *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetM*, *tetQ*, *tetW*) en cada una de las placas dentobacterianas recolectadas.
- 2) Cultivar, identificar y aislar estreptococos orales (*S. oralis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* y *S. gordonii*) a partir de cada una de las placas dentobacterianas.
- 3) Establecer por PCR la presencia o ausencia de nueve genes de resistencia a antibióticos (*blaTEM*, *cfxA*, *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetM*, *tetQ*, *tetW*) en cada una de las especies de estreptococos orales aislados.
- 4) Contrastar los perfiles de resistencia genética a antibióticos de la placa dentobacteriana y del estreptococo aislado de la misma placa dentobacteriana.

IV. METODOLOGÍA

La fase experimental fue llevada a cabo en el Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria (LIOM) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

El proyecto se dividió en tres grandes fases:

- I. Identificación por PCR de las cinco especies de estreptococos orales en cada una de las muestras, así como identificación de los nueve genes de resistencia a antibióticos.
- II. Identificación por PCR de las UFCs de estreptococos cultivados y aislados de cada uno de los participantes seleccionados.
- III. Identificación por PCR de la presencia o ausencia de nueve genes de resistencia a antibióticos en cada una de las especies de estreptococos orales aislados de cada uno de los participantes.

FASE I

4.1 Identificación por PCR de las cinco especies de estreptococos orales en cada una de las muestras, así como identificación de los nueve genes de resistencia a antibióticos.

4.1.1 Obtención de la placa dentobacteriana.

1.- Se invitaron a participar en el protocolo de investigación a 120 pacientes de la Clínica de Admisión y Diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Medicina que acudieron a solicitar atención odontológica, de los cuales 63 cumplieron con los criterios de selección y firmaron el consentimiento informado después de explicarles a detalle los objetivos y requerimientos del estudio.

Los criterios de selección fueron: Inclusión: 18 a 50 años, con al menos 28 órganos dentales, entre 9 y 13 caries activas sin compromiso pulpar. Y de exclusión: Pacientes con gingivitis o periodontitis, con enfermedades sistémicas, fumadores, pacientes que reportaron la ingesta de fármacos de cualquier tipo, incluidos los suplementos y

vitaminas y sobre todo antibióticos en los últimos 6 meses y aquellos pacientes que reportaron haber cepillado sus dientes 3 horas antes de la toma de muestra.

2.- Como parte del protocolo para su atención en la Clínica Odontológica, todos los pacientes pasaron por el Triage telefónico y presencial antes de su ingreso, posteriormente los encargados de la misma, en el área de Admisión y Diagnóstico realizaron su expediente digital completo, el cual incluye un odontograma que permite establecer la cantidad de dientes afectados por caries; en promedio la población de 18 - 62 años oscila entre 9 a 13 piezas afectas, siendo estos pacientes a los que se les invitó a participar.

3.- Se tomó una muestra de placa dentobacteriana supragingival de al menos 10 superficies dentales, de dientes anteriores y posteriores, incluyendo superficies bucales, linguales y caras oclusales utilizando una cureta de Lucas, colocándolas en tubos de ensayo con 6ml de BHI estéril; los cuales fueron identificados con un número.

4.- Cada una de las muestras fue llevada a un periodo de incubación a 36°C durante 12 horas antes de su procesamiento (Figura 1).



Figura 1. Incubación de las muestras.

4.1.2 Aislamiento de ADN de la muestra de placa dentobacteriana total

- 1.- Se llevó a cabo un concentrado de la muestra, centrifugando por 3 ocasiones 1ml de BHI a 13,000 rpm por 10 minutos, entre cada centrifugación fue descartado el sobrenadante y se lavó la muestra con 1000 µL con PBS.
- 2.- Se agregaron 30 µL de solución de lisis y 30 µL de proteinasa K y se incubaron los tubos durante 5 minutos a 80 ° C.
- 2.- Se incubaron a 37° C durante 30 minutos.
- 3.- Se agregaron 1.5 µL de RNAasa.
- 4.- Se agregaron 100 µL de solución de precipitación de proteínas para ser llevadas al vórtex por 20 segundos.
- 5.- Se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 rpm, y se colectó el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6.- Se agregaron 500µL de fenol-cloroformo alcohol isoamílico y se mezcló invirtiendo.
- 7.- Se centrifugó durante 10 minutos y posteriormente se llevó la capa acuosa a un nuevo tubo.
- 8.- Se agregaron 400 µL de isopropanol al 100% y se mezcló invirtiendo.
- 9.- Se incubaron los tubos en hielo durante 10 minutos, se centrifugaron y fue descartado el isopropanol.
- 10.- Se lavó el pellet con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó 10 minutos para posteriormente descartar el etanol.
- 11.- Se mantuvo secando el pellet por 4 horas.
- 12.- Se agregaron 60 µl de agua estéril para hidratar el DNA.
- 13.- Se almacenó a -70°C hasta su utilización.

4.1.3 Identificación de la posible presencia de cinco estreptococos orales en la placa dentobacteriana total por PCR.

- 1.- Se realizaron cinco PCR a cada uno de los tubos de ensayos (N=63) para asegurar la presencia de cada uno de los cinco estreptococos orales.
- 2.- Se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1), en reacciones de 20 µl, la reacción se llevó a cabo colocando 6 µl de agua bidestilada estéril, 0.8 µl de cada uno de los oligonucleótidos 10 µl de Taq y 2.4 µl del ADN previamente aislado; para ser colocadas las reacciones en el termociclador y llevar a cabo los 30 ciclos necesarios para dar lugar al producto deseado (Figura 2).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para identificar estreptococos orales.

Estreptococo oral	Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Alineamiento (°C)	Tamaño (pb)
<i>S. mutans</i>	MKD-F	5'GGCACCACAACATTGGGAAGCTCAGTT3'	70	433
	MKD-R	5'GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT3'		
<i>S. salivarius</i>	MKK-F	5'GTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG3'	66	544
	MKK-R	5'CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT3'		
<i>S. sanguis</i>	MKP-F	5'GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT3'	70	313
	MKP-R	5'GAACAGTTGCTGGACTTGCTTCTC3'		
<i>S. oralis</i>	MKR-F	5'TCCCGGTCAGCAAACCTCCAGCC3'	66	374
	MKR-R	5'GCAACCTTTGGGATTTGCAAC3'		
<i>S. gordonii</i>	MKG-F	5'CTATGCGGATGATGCTAATCAAGTG3'	55	440
	MKG-R	5'GGAGYCGCTATAATCTTGTCAGAAA3'		



Figura 2. Termociclador

3.- Cada producto fue cargado en geles de agarosa al 2% y sometido a electroforesis (Figura 3).

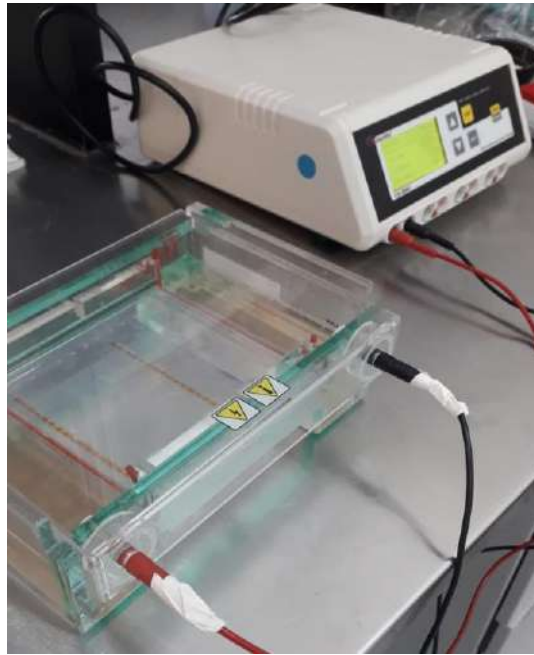


Figura 3. Electroforesis

4.- Se tiñó cada gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador UV (Figura 4 y 5).



Figura 4. Gel teñido.



Figura 5. Transiluminador UV.

5.- Se identificaron y documentaron la presencia o ausencia de bandas en el gel, de los estreptococos presentes en cada una de las muestras de los pacientes (Figura 6).

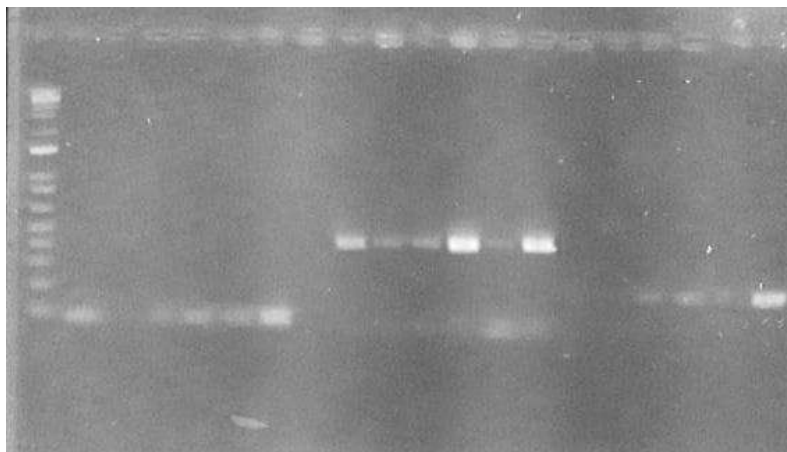


Figura 6. Visualización de gel de agarosa.

4.1.4. Identificación por PCR de la presencia o ausencia de nueve genes de resistencia a antibióticos en cada una de las muestras de cada uno de los pacientes.

1.- A cada uno de los aislamientos de ADN de la muestra de cada uno de los 63 pacientes incluidos, se le realizaron nueve PCR, cada uno con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para identificar la presencia o ausencia de los genes de resistencia a antibióticos comunes.

Tabla 2. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la detección de los nueve genes de resistencia a antibióticos.

Gen de Resistencia a Antibiótico	Secuencia del Oligonucleótido	Temperatura de Alineamiento (°C)	Amplicón (pb)
<i>blaTEM</i>	5'CCAATGCTTAATCAGTGAGG3' 5'ATGAGTATTCAACATTTCCG3'	50	858
<i>ermC</i>	5'AATC GGCTCAGGAAAAGG3' 5'ATCGTC AATTCCTGCATG3'	50	562
<i>cfxA</i>	5'GCGCAAATCCTCCTTTAACAA3' 5'ACCGCCACACCAATTTCCG3'	55	802
<i>tetM</i>	5'GTGGACAAAGGTAC AACGAG3' 5'CGGTAAAGTTCGTACACAC 3'	55	406
<i>tetW</i>	5'GAGAGCCTGCTATATGCCAGC3' 5'GGCGTATCCACAATGTAAAC3'	55	168
<i>tetQ</i>	5'TTATACTTCCTCCGGC ATCG3' 5'ATCGGTTCCGAGAATGTCCAC3'	55	904
<i>ermA</i>	5'AACACCCTGAACCCAAGGGACG3' 5'CTTCACATCCGGATTCGCTCGA3'	50	420
<i>ermB</i>	5'GAAAAGGTACTCAACCAAATA3' 5'AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC3'	55	639
<i>mecA</i>	5'-TAGGTA AAAATGTCTGGACATG3' 5'GCATCAASTGTATTGGATAGC3'	55	533

2.- Se realizaron reacciones de 20µl, la reacción se llevó a cabo colocando 6µl de agua bidestilada estéril, 0.8µl de cada uno de los oligonucleótidos, 10µl de Taq y 2.4µl del ADN previamente aislado (Figura 7).



Figura 7. Termociclador.

3.- Cada producto fue cargado en geles de agarosa al 2% y sometido a electroforesis (Figura 8).

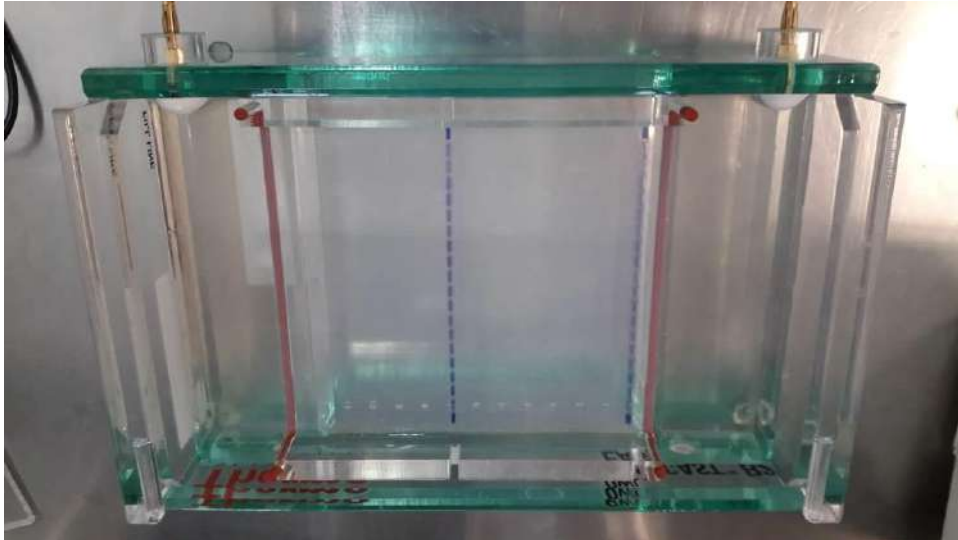


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los 9 genes de resistencia a antibióticos.

4.- Se tiñó cada gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador UV.

5.- Se identificó y documentó la presencia o ausencia de los nueve genes de resistencia a antibióticos mediante bandas en el gel, en cada una de las 63 muestras de los pacientes.

FASE II

4.2 Identificación por PCR de las UFCs de estreptococos cultivados y aislados de cada uno de los participantes seleccionados.

Para llevar a cabo esta segunda fase, fueron seleccionadas las 20 muestras con mayor número de genes de resistencia a antibióticos, primero se dio lugar al aislamiento de las colonias, para ello se sembraron 15 μ l de la muestra contenida en tubos de ensayo con

BHI en cajas Petri con agar *TYS20B* (Trypticasa de soja-extracto de levadura-sucrosa-bacitracina), agar específico para el crecimiento y desarrollo de estreptococos orales.

A continuación, se detalla la forma de preparación del agar y el método de sembrado y aislado de cada una de las colonias, así como su identificación mediante el uso de la técnica molecular PCR.

4.2.1 Preparación de medio de cultivo Trypticasa soya-extracto de levadura-Sucrosa-Bacitracina Agar (*TYS20B*).

- 1.- Se pesaron 40g del medio base agar tripticasa de soya, 10g de extracto de levadura y 15g de sacarosa en una báscula analítica.
- 2.- Se mezclaron en 1lt de agua destilada usando un matraz Erlenmeyer.
- 3.- Se calentó hasta su punto de ebullición con agitación hasta disolverse completamente (Figura 9).
- 4.- Se llevó el matraz a la autoclave y se esterilizó la solución a 121°C por 15 minutos.
- 5.- Una vez estéril, se dejó enfriar hasta los 40°C y se añadieron 0.2U/ml de Bacitracina y se agitó hasta disolver.
- 6.- Se distribuyó la mezcla homogénea en cajas Petri y se esperó hasta que estas gelificaron.
- 7.- Todas las placas se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.



Figura 9. Preparación del agar *TYS20B*.

4.2.2 Aislamiento e identificación de las UFCs de estreptococos orales.

1.- Cada microtubo fue vigorosamente agitado (vortex) y se tomaron 15 μ l que fueron depositados en cajas Petri previamente identificadas y preparadas con medio de cultivo selectivo para estreptococos orales (*TYS20B*).

2.- Se colocaron las cajas de cultivo en incubación durante 24 horas a 37°C en la incubadora microbiológica, bajo anaerobiosis parcial (Figura 10).



Figura 10. Incubación bajo anaerobiosis.

3.- Pasadas las 24 horas se observó crecimiento de diferentes colonias.

4.2.3 Identificación por PCR de las especies de estreptococos orales aislados de cada uno de los participantes.

De cada caja Petri, se aislaron de una a cuatro colonias con distinta morfología o colonias separadas entre sí con un asa bacteriológica en tubos Eppendorf con 1ml de PBS estéril (Figuras 11 y 12).



Figura 11. Observación y elección de colonias en estereomicroscopio.



Figura 12. Caja de cultivo de estreptococos orales.

4.2.4 Aislamiento del ADN de las colonias aisladas

- 1.- Cada uno de los tubos Eppendorf con 1ml de PBS con la colonia aislada, se colocó en la centrifuga a 13,000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó la muestra con 1000 μ L con PBS.
- 2.- Se agregaron 30 μ L de solución de lisis y 30 μ L de proteinasa K y se incubaron los tubos durante 5 minutos a 80 ° C.
- 2.- Se incubaron a 37° C durante 30 minutos.
- 3.- Se agregaron 1.5 μ L de RNA asa.
- 4.- Se agregaron 100 μ L de solución de precipitación de proteínas para ser llevadas al vórtex por 20 segundos.
- 5.- Se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 rpm, y se colectó el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6.- Se agregaron 500 μ L de fenol-cloroformo alcohol isoamílico y se mezcló invirtiendo el tubo.
- 7.- Se centrifugó durante 10 minutos y posteriormente se llevó la capa acuosa a un nuevo tubo.
- 8.- Se agregaron 400 μ L de isopropanol al 100% y se mezcló invirtiendo.
- 9.- Se incubaron los tubos en hielo durante 10 minutos, se centrifugaron y fue descartado el isopropanol.
- 10.- Se lavó el pellet con 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó 10 minutos para posteriormente descartar el etanol.
- 11.- Se mantuvo secando el pellet por 4 horas.
- 12.- Se agregaron 60 μ l de agua estéril para hidratar el DNA.
- 13.- Se almacenó a -70°C hasta su utilización.

4.2.5 Identificación de la especie de estreptococo aislada.

- 1.- Se realizaron 5 PCR a cada uno de los tubos Eppendorf (uno a cinco posibles) obtenidos de cada caja de cultivo.
- 2.- Se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 1), en reacciones de 20 μ l, la reacción se llevó a cabo colocando 6 μ l de agua bidestilada estéril, 0.8 μ l de cada uno de los oligonucleótidos, 10 μ l de Taq y 2.4 μ l del ADN previamente

aislado; para ser colocadas las reacciones en el termociclador y llevar a cabo los 30 ciclos necesarios para dar lugar al producto deseado.

3.- Cada producto fue cargado en geles de agarosa al 2% y sometido a electroforesis.

4.- Se tiñó cada gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador UV.

5.- Se identificaron y documentaron la presencia o ausencia de bandas en el gel, hasta lograr identificar todos los estreptococos orales en cada una de las colonias aisladas de cada una de las cajas petri.

FASE III

4.3. Identificación por PCR de la presencia o ausencia de nueve genes de resistencia a antibióticos en cada una de las especies de estreptococos orales aislados de cada uno de los participantes seleccionados.

1.- A cada uno de los tubos de estreptococos previamente identificados se le realizaron 9 PCR, cada uno con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para identificar la presencia o ausencia de los genes de resistencia a antibióticos comunes.

2.- Se utilizaron reacciones de 20µl, la reacción se llevó a cabo colocando 6µl de agua bidestilada estéril, 0.8µl de cada uno de los oligonucleótidos, 10µl de Taq y 2.4µl del ADN previamente aislado.

3.- Cada producto fue cargado en geles de agarosa al 2% y sometido a electroforesis.

4.- Se tiñó cada gel con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador UV.

5.- Se identificó y documentó la presencia o ausencia de los nueve genes de resistencia a antibióticos mediante bandas en el gel, en cada una de los estreptococos orales obtenidos de cada paciente.

DESECHOS

Los cultivos generados producto de la investigación, fueron neutralizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos, garantizando la eliminación de microorganismos patógenos y posteriormente fueron eliminados en bolsas de color rojo transparente, se llenaron al 80 por ciento de su capacidad, siendo etiquetadas para luego ser llevadas al almacenamiento temporal de la Facultad de Medicina.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM -087-ECOL-SSA1-2002, se estableció el manejo de residuos peligroso biológico-infecciosos en el Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria (LIOM).

V. RESULTADOS

Se revisaron 120 sujetos, de los cuales se incluyeron 63 sujetos que cumplieron los criterios de selección a los cuales se les tomó muestra de placa dentobacteriana

Las características de la población incluida se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Características de los pacientes incluidos (n=63)

	X± DE (Rango)
Edad	35.47 ± 11.89 (18-62)
Genero	Frecuencia (%)
Femenino	42 (66.66)
Masculino	21 (33.33)

En cada una de las muestras de placa dentobacteriana se realizó PCR para identificar la presencia o ausencia de cada una de las cinco especies bacterianas de interés con la finalidad de conocer la prevalencia de dichas especies en la población muestreada y asegurar su presencia en la muestra que sería seleccionada para la etapa dos de la investigación. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de las cinco especies de estreptococos en los 63 sujetos incluidos.

Especie bacteriana	Frecuencia (%)
<i>S. oralis</i>	56 (88.8)
<i>S. sanguis</i>	44 (69.8)
<i>S. gordonii</i>	44 (69.8)
<i>S. salivarius</i>	41 (65.0)
<i>S. mutans</i>	28 (44.4)

En la tabla 5 se muestra el número de especies que presentaron los sujetos incluidos en la placa dentobacteriana.

Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de especies de estreptococos en la población muestreada (n=63).

Numero de especie bacteriana	Frecuencia (%)
5 especies	17 (26.9)
4 especies	18 (28.5)
3 especies	9 (14.2)
2 especies	10 (15.8)
1 especies	9 (14.2)

De igual forma, en cada una de las muestras de placa dentobacteriana se realizó PCR para cada uno de los nueve genes de resistencia a antibióticos con la finalidad de conocer la prevalencia de dichos genes en cada una de las muestras de placa dental total de toda la población muestreada y asegurar su presencia en la muestra que sería seleccionada para la etapa dos. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Frecuencia y porcentaje de los nueve genes de resistencia de interés en la placa dental total de la población incluida (n=63).

Genes de resistencia a antibióticos	Frecuencia (%)
<i>tetM</i>	53 (84.1)
<i>tetQ</i>	16 (25.3)
<i>tetW</i>	24 (38.0)
<i>ermA</i>	5 (7.93)
<i>ermB</i>	35 (55.5)
<i>ermC</i>	17 (26.9)
<i>blaTEM</i>	27 (42.8)
<i>cfxA</i>	9 (14.2)
<i>mecA</i>	5 (7.9)

En la tabla 7 se muestra el número de pacientes que presentó diferente número de genes de resistencia a antibióticos en su placa dentobacteriana total.

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de genes de resistencia a antibióticos en la población (n=63).

Número de genes de resistencia a antibióticos	Frecuencia (%)
9	0
8	0
7	0
6	5 (7.9)
5	15 (23.8)
4	9 (14.2)
3	9 (14.2)
2	7 (11.1)
1	9 (14.2)
0	9 (14.2)

Para la siguiente etapa de la investigación, se seleccionaron las 20 muestras con mayor número de genes de resistencia a antibióticos (5 muestra con 6 genes y 15 muestras con 5 genes).

Después de sembrar e incubar las muestras, se seleccionaron entre una y cuatro UFCs de cada caja, preferentemente de distinta morfología o si eran iguales que estuvieran alejadas entre sí. Se recolectaron 41 UFC, cada una de las UFC seleccionadas se almacenó por separado, se le extrajo ADN y se le realizó PCR para identificarlas como alguna de las especies de interés.

Tabla 8. Número de cepas seleccionadas e identificadas.

Especie bacteriana	Identificadas
<i>S. oralis</i>	8
<i>S. sanguis</i>	9
<i>S. gordonii</i>	12
<i>S. salivarius</i>	3
<i>S. mutans</i>	1
Ninguna	8

Debido a que solo se identificó una cepa de *S. mutans* y tres de *S. salivarius* (pero dos provenían del mismo paciente) Se trabajó solo con *S. oralis*, *S. sanguis* y *S. gordonii*. De estas tres cepas se excluyeron las cepas que procedían de un mismo paciente, de forma que al final se trabajó con: siete cepas de *S. sanguis*; seis cepas de *S. oralis*; nueve cepas de *S. gordonii*.

A cada una de las cepas se les realizó PCR para identificar la presencia o ausencia de los 9 genes de resistencia a antibióticos de interés.

Tabla 9. Frecuencia y porcentaje en la que se encuentran los genes de resistencia a antibióticos en las 22 cepas procedentes de sujetos con cinco o seis genes de resistencia a antibióticos en su placa dental

	<i>S. sanguis</i> (n=7)	<i>S. oralis</i> (n=6)	<i>S. gordonii</i> (n=9)
<i>tetM</i>	7 (100)	4 (66.7)	5 (55.6)
<i>blaTEM</i>	5 (71.4)	5 (83.3)	3 (33.3)
<i>tetW</i>	3 (42.9)	5 (83.3)	5 (55.6)
<i>ermC</i>	2 (28.6)	3 (50)	1 (11.1)
<i>mecA</i>	1 (14.3)	3 (50)	1 (11.1)
<i>ermB</i>	2 (28.6)	1 (16.7)	1 (11.1)
<i>tetQ</i>	1 (14.3)	0	1(11.1)
<i>ermA</i>	0	0	0
<i>cfxA</i>	0	0	0

Tabla 10. Frecuencia y porcentaje en la que se encuentran diferente número de genes de resistencia a antibióticos en las 22 cepas obtenidas de sujetos con 5 o 6 genes de resistencia a antibióticos en su placa dentobacteriana.

	<i>S. sanguis</i> (n=7)	<i>S. oralis</i> (n=6)	<i>S. gordonii</i> (n=9)
6-9 genes	0	0	0
5 genes	0	3 (50)	0
4 genes	2 (28.5)	1 (16.6)	1 (11.1)
3 genes	3 (42.85)	0	2 (22.2)
2 genes	2 (28.5)	1 (16.6)	3 (33.3)
1 gen	0	0	1 (11.1)
Ninguno de los genes	0	1 (16.6)	2 (22.2)

VI. DISCUSIÓN

Este estudio incluyó a una población de entre 18 a 62 años de edad, rango en el cuál de acuerdo al SIVEPAB se presenta el mayor número de órganos dentales con presencia de caries y que oscila entre nueve y 13 piezas afectadas (Nathan and Scobell 2012). El género femenino fue el más frecuente (63%) debido a que la mayor parte de los pacientes que acuden en busca de atención Odontológica a la Clínica de Odontología de la Facultad de Medicina, son mujeres. Se ha reportado que las mujeres tienen mayor conciencia de prevención y se preocupan más por su salud oral que los hombres, además que poseen menor temor a la consulta dental (Redondo 2006; Beaton 2014).

Durante la etapa de recolección de muestras, se examinaron 120 pacientes con caries, de los cuales se incluyeron 63 que cumplieron con los criterios de selección y a los que les fue tomada una muestra de placa dentobacteriana.

Primeramente y a partir del ADN obtenido de una alícuota de cada una de las muestras y por medio de la técnica de PCR y oligonucleótidos específicos se realizó la búsqueda de las cinco especies de interés (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* y *S. gordonii*). De esta forma se pudieron elegir las muestras de los pacientes en donde se tendría mayor probabilidad de identificar y aislar la mayor cantidad de las especies.

Esta primera parte del protocolo también generó resultados relevantes, pues no existen reportes previos de la frecuencia con que se encuentran estas especies bacterianas en la placa dentobacteriana de sujetos con caries sin otro tipo de infección oral o enfermedad sistémica.

De forma interesante, se encontró que, del total de las muestras, solo el 26.9% presentó simultáneamente las cinco especies de interés, esto resulta distinto a lo reportado en el único trabajo de referencia en población mexicana que buscó estas mismas especies bacterianas (Loyola *et al.* 2017), donde el 47.5% de las muestras las presentaron. Sin embargo esta mayor frecuencia seguramente está asociada a que las muestras fueron tomadas de un nicho de la cavidad oral distinto, en nuestro caso las muestras fueron de placa dentobacteriana y en el caso de Loyola y colaboradores se tomaron del conducto radicular en donde existen condiciones nutritivas, temperatura y de concentración de oxígeno distintas, lo que resulta en poblaciones bacterianas diferentes, además y más importante, fueron tomadas durante el curso de un proceso infeccioso.

Por otro lado, se observó de forma interesante que *S. mutans* fue la especie menos frecuente en nuestras muestras, a pesar de que ha sido la bacteria más asociada con caries dental (Warren 2009), lo que pone en evidencia un área de investigación que necesita ser más explorada, pues hay que recordar que uno de los criterios de selección de los pacientes era que presentaran caries dental y se esperaba una alta frecuencia de *S. mutans* en estas muestras.

De la misma forma y para ayudar en la selección de las muestras que se debían cultivar, se realizó la búsqueda de los nueve genes de resistencia a antibióticos de interés (*tetM*, *tetW*, *tetQ*, *ermC*, *ermB*, *ermA*, *mecA*, *blaTEM*, *cfxA*). Los resultados de esta búsqueda también proporcionaron información relevante que si bien, por el número limitado de muestras procesadas no es contundente, al menos da una aproximación epidemiológica de la prevalencia con la que se presentan actualmente dichos genes de resistencia a antibióticos en nuestra población.

Se observaron frecuentemente los genes de resistencia a tetraciclinas (*tetM* 84.1%), eritromicinas-macrólidos (*ermB* 55.5%) y penicilinas-betalactámicos (*blaTEM* 42.8%) lo que en cierta forma era de esperarse pues son los antibióticos que más se utilizan en México (Ponce 2019). Mientras que uno de los genes menos encontrados fue *mecA* (7.9%), el cual está relacionado con resistencia a meticilina un antibiótico no muy utilizado (Pyzik 2019) solo cinco pacientes lo presentaron.

Al realizar el análisis por número de genes de resistencia a antibióticos en cada uno de las muestras se observó que ningún paciente presentó más de siete, pero de forma preocupante 20 pacientes (31.7%) presentaron entre cinco y seis. Mientras que solo nueve pacientes (el 14.2%) resultaron negativos a los nueve genes de resistencia a antibióticos.

La frecuencia con que se presentan estos genes de resistencia a antibióticos ha sido parcialmente reportada en algunas investigaciones para distintas poblaciones y a partir de muestras obtenidas de diferentes nichos de la cavidad oral, entre ellos los carrillos, lengua, bolsa periodontal, conductos radiculares, y hasta de saliva.

El primero al que se debe hacer mención es a un trabajo publicado por este mismo grupo de investigación (Pérez-Serrano 2020) que, aunque su objetivo fue otro, se generó información en cuanto a la frecuencia con que se presentaron seis de los genes de resistencia a antibióticos en placa dental de adultos con similares características en

México. Algunos de los genes se presentaron con marcadas similitudes, por ejemplo, el gen *tetM* fue el que se presentó más frecuentemente en ambos trabajos (84% y 60%, respectivamente). Los genes *tetW*, *blaTEM* y *ermC* los reportaron en el 31.6, 36.6 y 16.6% respectivamente, mientras que en la presente investigación se encontraron en el 38, 42.8 y 26.9% respectivamente.

Por otra parte, en Grecia, Ioannidis (2009) buscaron la presencia de los genes de resistencia a antibióticos: *tetM*, *tetQ*, y *blaTEM* en muestras de placa dentobacteriana, de pacientes adultos; en su investigación se observó una alta prevalencia de *tetM* (69.2%) y *blaTEM* (46.2%), similar a lo obtenido en nuestros resultados *tetM* (84%) y *blaTEM* (42.8%). Con respecto al gen *tetQ*, dichos autores lo encontraron en un 76.9%, mientras que en este estudio se encontró en el 25.3%. Años más tarde, también en Grecia, Kuokos (2016) determinó la presencia del gen *blaTEM* en muestras de placa dentobacteriana encontrándolos con muy alta frecuencia (71%) en contraste con el estudio de Ioannidis (46.2%) y con los resultados de esta investigación (42.8%), pero de forma importante, ellos reportan una correlación de esa alta frecuencia con el elevado consumo de beta-lactámicos en su población muestreada, lo que explica su alta frecuencia.

Como ya se mencionó, no existen trabajos similares con los que se puedan contrastar totalmente los resultados. Se ha reportado la frecuencia con que se presentan los genes de interés en la cavidad oral, pero en otros nichos distintos al de nuestro interés. Uno de los más populares es el conducto radicular, un nicho de donde solo se pueden obtener muestras cuando existe un proceso patológico en la pulpa dental y esta ya se encuentra necrótica y en el espacio que ocupaba ahora se encuentran microorganismos. Rocas y colaboradores (2012) buscaron la presencia de algunos de los genes de resistencia a antibióticos con los que se trabajó en esta investigación en microorganismos presentes en este nicho. Los genes más frecuentes que ellos reportaron fueron *blaTEM* y *ermC* presentándose ambos en un 24% (en nuestro caso 42 y 26% respectivamente), seguidos de *tetW* en un 12% (nuestro caso 38%) y *tetM* en un 8% (en nuestro caso 84%). Además, reportan no haber encontrado la presencia de *tetQ*, ni de *cfxA*; mientras que, en esta investigación, ambos fueron encontrados en el 25.3 y 14.2% respectivamente. Resultan muy evidentes las diferencias en la presencia de estos genes en ambos nichos. Es fácil pensar que estas diferencias son principalmente debido a los diferentes nichos, y a que la microbiota existente en cada uno de ellos es distinta, principalmente por las

diferencias ambientales de cada uno de ellos que promueve el crecimiento de distintos géneros y especies bacterianas). Sin embargo, en otro estudio realizado a partir también de muestras de conducto radicular y que fue realizado en nuestra población y por nuestro grupo de investigación (Domínguez-Pérez 2018) se identificó que las frecuencias con las que se encontraron dichos genes fueron mucho más altas a las reportadas por Rocas (en el mismo nicho, conducto radicular) y más similares a lo que se encontró en la presente investigación lo que indudablemente nos lleva a pensar en que en general y sin importar mucho la procedencia específica de la muestra (nicho), mientras esta provenga de algún nicho de la cavidad oral, las diferencias o similitudes se pueden atribuir más a la población muestreada, ya que dicha población está expuesta por ejemplo a diferentes regímenes antibióticos, ya sea de forma directa, por consumo terapéutico, o indirecta por alimentos o contacto con otros seres humanos o animales. Por ejemplo, el gen *tetM* se encontró en el 83.9% en el conducto radicular, mientras que en esta investigación (en placa dentobacteriana) se encontró en el 84.1%. Por otra parte, también se pudo confirmar que los genes *tetQ* y *cfxA* son de los que menos frecuentemente están en nuestra población, pues en su caso (Domínguez-Pérez 2018) no los encontraron en ninguna muestra, mientras que en esta investigación se encontraron en el 25.3% y 14.2% respectivamente, siendo ambos de los menos frecuentes.

Finalmente, y una vez que se caracterizaron las 63 muestras de los pacientes se eligieron las 20 con el mayor número de estreptococos y genes de resistencia a antibióticos, las cuales fueron cultivadas en agar y de donde se realizó el aislamiento e identificación de 41 cepas. Solo 33 fueron identificadas y se trabajó solo con 22 cepas que provenían de distinto paciente (nueve de *S. gordonii*, siete de *S. sanguis* y seis de *S. oralis*). A cada una de estas cepas se le caracterizó buscando la presencia de los nueve genes de resistencia a antibióticos y así determinar si cada cepa específica podría ser considerada como reservorio frecuente de alguno de los genes de resistencia a antibióticos.

No existen precedentes que intenten establecer si una especie bacteriana específica puede ser considerada como reservorio frecuente de genes de resistencia a antibióticos. Por lo tanto, no existe un método o una fórmula para determinarlo. Nuestra propuesta para esto es considerar que una especie bacteriana es reservorio frecuente de un gen específico de resistencia a antibióticos cuando el gen de interés se presenta en la muestra de placa dentobacteriana de al menos 10 pacientes y que posteriormente estando aisladas esas 10 cepas el gen se presenta en más del 50% de ellas, en el

entendido de que al presentarlo exactamente en el 50% de las cepas se tendrían las mismas probabilidades de ser o no reservorio del gen, y que presentarlo en menos del 50% de las cepas se considerará que dicha especie bacteriana no es reservorio frecuente de ese gen específico.

Cabe señalar que esta propuesta aún no pudo ser aplicada en este trabajo ya que debido a complicaciones técnicas derivadas de la contingencia que causó la pandemia por COVID-19 no se lograron tener 10 cepas de cada una de las especies de interés, sin embargo, en algunos casos ya se pueden observar resultados que al completar las muestras solo serían confirmados.

S. sanguis del cual solo se pudieron identificar y aislar siete cepas, resultó ser una especie que puede ser considerada reservorio frecuente de los genes de resistencia *tetM* y *blaTEM* ya que se encontraron en el 100 y 71.4% y con la posibilidad de que también lo sea de *tetW* que actualmente se encontró en el 42.9%. De los genes de los cuales definitivamente no es reservorio frecuente son *ermA* y *cfxA* pues no se encontraron en ninguna cepa. Tampoco podrían serlo de los genes *ermC*, *mecA*, *ermB* ni *tetQ*, pues se presentaron en el 28.6, 14.3, 28.6 y 14.3% y aunque salieran positivos en las tres muestras que faltan, ya no podrían llegar a presentarse en más del 50%.

Con respecto a *S. gordonii* del que se pudieron identificar y aislar 9 cepas, existe la posibilidad de que pueda ser considerado reservorio frecuente de los genes *tetM* y *tetW* pues actualmente se presentaron en el 55.6% de las muestras. De los genes para los que definitivamente no es un reservorio frecuente son *blaTEM*, *ermC*, *mecA*, *ermB*, *tetQ*, *ermA* y *cfxA* pues ni, aunque se presentaran en la muestra que falta para completar el grupo se lograría que estén en más del 50%.

Por último, *S. oralis* del que solo se pudieron identificar y aislar 6 cepas, existe la posibilidad de que pueda ser considerado reservorio frecuente de los genes *mecA*, *ermC*, *tetW*, *blaTEM* y *tetM* pues al completar la muestra, podrían estar presentes en más del 50%. De los genes de los cuales definitivamente no puede ser considerado reservorio frecuente son *ermB*, *tetQ*, *ermA* ni *cfxA*, pues ni, aunque estuvieran presentes en las cepas faltantes podrían alcanzar más del 50% (Tabla 10).

Tabla 11. Genes de resistencia a antibióticos de los que pueden o no ser reservorios frecuentes las especies de interés.

Especie bacteriana	Reservorio frecuente	Posible reservorio	NO es reservorio frecuente
<i>S. sanguis</i>	<i>tetM, blaTEM</i>	<i>tetW</i>	<i>ermA, ermB, ermC, mecA, cfxA, tetQ</i>
<i>S. gordonii</i>	-----	<i>tetM, tetW</i>	<i>blaTEM, ermA, ermB, ermC, mecA, cfxA, tetW.</i>
<i>S. oralis</i>	-----	<i>mecA, ermC, tetW, blaTEM, tetM</i>	<i>ermB, tetQ, ermA, cfxA</i>

Resulta fundamental el poder completar cada uno de los grupos y así tener los resultados definitivos, aunque en algunos casos los resultados ya son contundentes.

Por otro lado, se pudo observar aún con los resultados parciales, que *S. oralis* fue la especie que presentó más genes de resistencia distintos, el 50% de las cepas presentaron cinco de los genes de interés. *S. sanguis* presentó en el 42.8% de las cepas, tres genes y *S. gordonii* presentó en el 33.3% solo dos de los genes de interés.

Debido a las limitaciones de este estudio, principalmente a la falta de muestras que completen los grupos de interés, no se puede determinar hasta el momento si los estreptococos orales estudiados son reservorio frecuente o no de todos los genes de resistencia a antibióticos, hace falta completar los grupos y continuar con más investigaciones que ayuden a demostrarlo.

CONCLUSIÓN

Hasta el momento y bajo la propuesta para determinar cuándo una especie bacteriana es reservorio frecuente de genes de resistencia a antibióticos, solo el *S. sanguis* puede ser considerado reservorio frecuente de los genes *tetM* y *blaTEM*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, N, K Navarrete, D Robles, and SH Aguilar. 2009. "Dientes Sanos, Cariados, Perdidos y Obturados En Los Estudiantes de La Universidad de Nayarit." *Revista Odontológica Latinoamericana* 1 (2): 27–32.
- Baehni, P C, and Y Takeuchi. 2003. "Anti-plaque Agents in the Prevention of Biofilm-associated Oral Diseases." *Oral Diseases* 9: 23–29.
- Barceló, Antonio Mestre, Inmaculada Cadenas Cortina, Ana Isabel Ambrona Rodríguez, and César Rodríguez Ballesteros. 2016. "Climatología Del Balneario de Villavieja." *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia* 82 (5): 108–26.
- Bowen, William H. 2002. "Do We Need to Be Concerned about Dental Caries in the Coming Millennium?" *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13 (2): 126–31.
- Byers, Helen L, Edward Tarelli, Karen A Homer, and David Beighton. 1999. "Sequential Deglycosylation and Utilization of the N-Linked, Complex-Type Glycans of Human A1-Acid Glycoprotein Mediates Growth of Streptococcus Oralis." *Glycobiology* 9 (5): 469–79.
- Chung, Jin-Hwan, Young Kyung Kim, Kyo-Han Kim, Tae-Yub Kwon, Seyede Ziba Vaezmomeni, Mohammad Samiei, Marzyeh Aghazadeh, Soodabeh Davaran, Mehrdad Mahkam, and Ghale Asadi. 2016. "Synthesis, Characterization, Biocompatibility of Hydroxyapatite–Natural Polymers Nanocomposites for Dentistry Applications." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44 (1): 277–84.
- Cvitkovitch, Dennis G., Yung Hua Li, and Richard P. Ellen. 2003. "Quorum Sensing and Biofilm Formation in Streptococcal Infections." *Journal of Clinical Investigation* 112 (11): 1626–32.
- Dalhoff, Axel, and Christopher J Thomson. 2003. "The Art of Fusion: From Penams and Cepheids to Penems." *Chemotherapy* 49 (3): 105–20.
- Domínguez-Pérez RA, De la Torre-Luna R, Ahumada-Cantillano M, Vázquez-Garcidueñas MS, Pérez-Serrano RM, Martínez-Martínez RE, Guillén-Nepita AL. 2018. Detection of the antimicrobial resistance genes *blaTEM*, *cfxA*, *tetQ*, *tetM*, *tetW* and *ermC* in endodontic infections of a Mexican population. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 15; 20-24.
- Essack, Sabiha Y. 2001. "The Development of β -Lactam Antibiotics in Response to the

- Evolution of β -Lactamases.” *Pharmaceutical Research* 18 (10): 1391–99.
- García C, Patricia. 2003. “Resistencia Bacteriana En Chile.” *Revista Chilena de Infectología* 20 (1): 11–23.
- Gibbons, R. J. 1989. “Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases.” *Journal of Dental Research* 68 (5): 750–60.
- Godínez Morales, Alma Gracia, and Elisa Luengas Quintero. 2009. “Epidemiology of Tooth Decay and Risk Factors Associated to Primary Dentition in Preschoolers.” *Revista de La Asociación Dental Mexicana* 66 (3): 10–20.
- Gong, Ke, Lynn Mailloux, and Mark C. Herzberg. 2000. “Salivary Film Expresses a Complex, Macromolecular Binding Site for *Streptococcus Sanguis*.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (12): 8970–74.
- Hamada, S., and H. D. Slade. 1980. “Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus Mutans*.” *Microbiological Reviews* 44 (2): 331–84.
- Hannig, Christian, Matthias Hannig, and Thomas Attin. 2005. “Enzymes in the Acquired Enamel Pellicle.” *European Journal of Oral Sciences* 113 (1): 2–13.
- Hannig, Matthias. 1999. “Ultrastructural Investigation of Pellicle Morphogenesis at Two Different Intraoral Sites during a 24-h Period.” *Clinical Oral Investigations* 3 (2): 88–95.
- Hojo, K., S. Nagaoka, T. Ohshima, and N. Maeda. 2009. “Critical Review in Oral Biology & Medicine: Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development.” *Journal of Dental Research* 88 (11): 982–90.
- Hoogmoed, C G Van, G I Geertsema-Doornbusch, Wim Teughels, Marc Quirynen, H J Busscher, and H C Van der Mei. 2008. “Reduction of Periodontal Pathogens Adhesion by Antagonistic Strains.” *Oral Microbiology and Immunology* 23 (1): 43–48.
- Ian, Chopra, and Roberts Marilyn. 2001. “Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (3): 232–60.
- Ioannidis I, Sakellari D, Spala A, Arsenakis M, Konstantinidis A. 2009. Prevalence of tetM, tetQ, nim and blaTEM genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*; 36: 569-574.
- Jenkinson, Howard F., and Donald R. Demuth. 1997. “Structure, Function and Immunogenicity of Streptococcal Antigen I/II Polypeptides.” *Molecular Microbiology* 23 (2): 183–90.

- Jenkinson, Howard F, and Richard J Lamont. 2005. "Oral Microbial Communities in Sickness and in Health." *Trends in Microbiology* 13 (12): 589–95.
- Jungermann, Gretchen B, Krystal Burns, Renu Nandakumar, Mostafa Tolba, Richard A Venezia, and Ashraf F Fouad. 2011. "Antibiotic Resistance in Primary and Persistent Endodontic Infections." *Journal of Endodontics* 37 (10): 1337–44.
- Kanwar, Indulata, Abhishek K. Sah, and Preeti K. Suresh. 2017. "Biofilm-Mediated Antibiotic-Resistant Oral Bacterial Infections: Mechanism and Combat Strategies." *Current Pharmaceutical Design* 23 (14): 2084–95.
- Kishimoto, E., D. I. Hay, and R. J. Gibbons. 1989. "A Human Salivary Protein Which Promotes Adhesion of Streptococcus Mutans Serotype c Strains to Hydroxyapatite." *Infection and Immunity* 57 (12): 3702–7.
- Kolenbrander, P E, R N Andersen, D S Blehert, P G Eglund, J S Foster, and R J Palmer Jr. n.d. "Jr (2002)." *Communication among Oral Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev* 66: 486–505.
- Kouidhi, Bochra, Yasir Mohammed A Al Qurashi, and Kamel Chaieb. 2015. "Drug Resistance of Bacterial Dental Biofilm and the Potential Use of Natural Compounds as Alternative for Prevention and Treatment." *Microbial Pathogenesis* 80: 39–49.
- Koukos, Georgios, Antonios Konstantinidis, Lazaros Tsalikis, Minas Arsenakis, Theodora Slini, and Dimitra Sakellari. 2016. "Prevalence of β -Lactam (BlaTEM) and Metronidazole (Nim) Resistance Genes in the Oral Cavity of Greek Subjects." *The Open Dentistry Journal* 10 (1): 89–98.
- Krishnakumar, R., Mathew John Kuzhimattam, and Gaurav Kumar. 2015. "Ogilvie's Syndrome Following Posterior Spinal Instrumentation in Thoraco Lumbar Trauma." *Journal of Craniovertebral Junction and Spine* 6 (4): 179–82.
- Kumar, Purnima S., Ann L. Griffen, Melvin L. Moeschberger, and Eugene J. Leys. 2005. "Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 3944–55.
- Lancaster, Holli, Raman Bedi, Michael Wilson, and Peter Mullany. 2005. "The Maintenance in the Oral Cavity of Children of Tetracycline-Resistant Bacteria and the Genes Encoding Such Resistance." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (3): 524–31.
- Li, Yihong, and Drph Anne Tanner. 1998. "Conference Paper." *International Journal of*

Medical Informatics 49 (1): S33–36.

- Lins, Renata Ximenes, Aurimar de Oliveira Andrade, Raphael Hirata Junior, Melanie J Wilson, Michael A O Lewis, David W Williams, and Rivail Antonio Sergio Fidel. 2013. “Antimicrobial Resistance and Virulence Traits of *Enterococcus Faecalis* from Primary Endodontic Infections.” *Journal of Dentistry* 41 (9): 779–86.
- Loyola-Rodriguez JP, Ponce-Diaz ME, Loyola-Leyva A, Garcia-Cortes JO, Medina-Solis CE, Contreras-Ramirez AA, Serena-Gomez E. 2017. Determination and identification of antibiotic resistance oral streptococci isolated from active dental infections in adults. *Acta Odontologica Scandinavica*.
- Maheswari, S Uma, Jacob Raja, Arvind Kumar, and R Gnana Seelan. 2015. “Caries Management by Risk Assessment: A Review on Current Strategies for Caries Prevention and Management.” *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 7 (2): S320.
- Marsh, Philip D. 2009. “Dental Plaque as a Biofilm: The Significance of PH in Health and Caries.” *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)* 30 (2): 76–78.
- Melo, WCMA, and Janice R Perussi. 2013. “Strategies to Overcome Biofilm Resistance.” *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education. Badajoz, Spain: Formatex Research Center*, 179–87.
- Mitchell, Timothy J. 2003. “The Pathogenesis of Streptococcal Infections: From Tooth Decay to Meningitis.” *Nature Reviews Microbiology* 1 (3): 219–30.
- Moon, Sang-Eun, Hye-Young Kim, and Jeong-Dan Cha. 2011. “Synergistic Effect between Clove Oil and Its Major Compounds and Antibiotics against Oral Bacteria.” *Archives of Oral Biology* 56 (9): 907–16.
- Nakayama, Ayako, Ayuko Takao, Hiroyuki Usui, Hiroyuki Nagashima, Nobuko Maeda, and Katsunori Ishibashi. 2006. “Beta-Lactam Resistance in *Streptococcus Mitis* Isolated from Saliva of Healthy Subjects.” *International Congress Series* 1289: 115–18.
- Nyvad, B, and M Kilian. 1990. “Comparison of the Initial Streptococcal Microflora on Dental Enamel in Caries-Active and in Caries-Inactive Individuals.” *Caries Research* 24 (4): 267–72.
- Nyad, Bente and Olefejers Kov 1987. “Scanning Electron Microscopy of Early Microbial Colonization of Human Enamel and Root Surfaces in Vivo.” *European Journal of Oral Sciences* 95 (4): 287–96.

- Ohta, Mitsuhiro, Hiroya Gotouda, Takanori Ito, Noriko Shinozaki Kuwahara, Tomoko Kurita Ochiai, Chieko Taguchi, Ikuo Nasu, and Michiharu Shimosaka. 2017. "Evaluation of the Proportion of Cariogenic Bacteria Associated with Dental Caries." *Epidemiology: Open Access* 07 (05).
- Paster, Bruce J, Lauren N Stokes, Ingar Olsen, Floyd E Dewhirst, and Jørn A Aas. 2005. "Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (11): 5721–32.
- Pérez Serrano RM, Domínguez-Pérez RA, Ayala-Herrera JL, Luna-Jaramillo AE, Zaldivar-Lelo de Larrea G, Solís-Sainz JC, Garcia-Solís P, Loyola-Rodríguez JP. 2020. Dental plaque microbiota of pet owners and their dogs as a shared source and reservoir of antimicrobial resistance genes. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.
- Ponce de León, S. *et al.* 2019. Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Resporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Poole, K. 2004. "Resistance to β -Lactam Antibiotics." *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (17): 2200–2223.
- Post, J. Christopher, N. Luisa Hiller, Laura Nistico, Paul Stoodley, and Garth D. Ehrlich. 2007. "The Role of Biofilms in Otolaryngologic Infections: Update 2007." *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 15 (5): 347–51.
- Pyzik E, Marek A, Stepień D, Uban R, Jaroz L, Jagiello I. 2018. Detection of antibiotic resistance and classical enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from poultry in Poland. *Journal of Veterinary Research* 63, 183-190.
- Roberts, Adam P., and Peter Mullany. 2010. "Oral Biofilms: A Reservoir of Transferable, Bacterial, Antimicrobial Resistance." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8 (12): 1441–50.
- Roberts, Adam P, Jonathan Pratten, Michael Wilson, and Peter Mullany. 1999. "Transfer of a Conjugative Transposon, Tn 5397 in a Model Oral Biofilm." *FEMS Microbiology Letters* 177 (1): 63–66.
- Rôças, Isabela N, and José F Siqueira Jr. 2013. "Antibiotic Resistance Genes in Anaerobic Bacteria Isolated from Primary Dental Root Canal Infections." *Anaerobe* 18 (6): 576–80.
- Rogers, J. D., Jr Palmer, P. E. Kolenbrander, and F. A. Scannapieco. 2001. "Role of

- Streptococcus Gordonii Amylase-Binding Protein A in Adhesion to Hydroxyapatite, Starch Metabolism, and Biofilm Formation.” *Infection and Immunity* 69 (11): 7046–56.
- Sabella, Camille, Daniel Murphy, and Jonathan Drummond-Webb. 2001. “Endocarditis Due to Streptococcus Mitis with High-Level Resistance to Penicillin and Ceftriaxone.” *Jama* 285 (17): 2195.
- Seville, Lorna A., Andrea J. Patterson, Karen P. Scott, Peter Mullany, Michael A. Quail, Julian Parkhill, Derren Ready, Michael Wilson, David Spratt, and Adam P. Roberts. 2009. “Distribution of Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes among Human Oral and Fecal Metagenomic DNA.” *Microbial Drug Resistance* 15 (3): 159–66.
- Siqueira, W L, H C Margolis, E J Helmerhorst, F M Mendes, and F G Oppenheim. 2010. “Evidence of Intact Histatins in the in Vivo Acquired Enamel Pellicle.” *Journal of Dental Research* 89 (6): 626–30.
- Siu, Leung-Kei. 2002. “Antibiotics: Action and Resistance in Gram-Negative Bacteria.” *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection= Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 35 (1): 1–11.
- Socransky, Sigmund S, Claire Smith, and Anne D Haffajee. 2002. “Subgingival Microbial Profiles in Refractory Periodontal Disease.” *Journal of Clinical Periodontology* 29 (3): 260–68.
- Soet, J J De, Bente Nyvad, and Mogens Kilian. 2000. “Strain-Related Acid Production by Oral Streptococci.” *Caries Research* 34 (6): 486–90.
- Stephens, Craig. 2002. “Microbiology: Breaking down Biofilms.” *Current Biology* 12 (4): R132–34.
- Walker, Clay B. 1996. “The Acquisition of Antibiotic Resistance in the Periodontal Microflora.” *Periodontology 2000* 10 (1): 79–88.
- Walter J. Loesche. 1986. “Role of Streptococcus Mutans in Human Dental Decay.” *Microbiological Reviews* 50 (4): 353–80.
- Warburton, Philip J, Richard M Palmer, Mark A Munson, and William G Wade. 2007. “Demonstration of in Vivo Transfer of Doxycycline Resistance Mediated by a Novel Transposon.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (5): 973–80.
- Warren JJ, Weber-Gasparoni K, Marshall TA, Drake DR, Dehkordi-Vakil F, Dawson DV, et al. 2009. A longitudinal study of dental caries risk among very young low SES children. *Community Dent Oral Epidemiol* 37:116–22

VIII. ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento

Firma del participante Firma del padre o tutor

Fecha: _____

Testigo 1. _____

Testigo 2. _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante): He explicado al Sr(a). _____ La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación.

He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda.

Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y repuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y firma del investigador. LO. ERB. Verónica Morales Dorantes, alumna de 4to semestre de la Maestría en Ciencias en Biomedicina en la Facultad de Medicina de la UAQ
Correo electrónico: veronica.morado@live.com.mx

Fecha: _____

CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo:

ESTREPTOCOCOS ORALES Y SU POSIBLE ROL COMO RESERVORIOS DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Investigador principal: LO. ERB. Verónica Morales Dorantes, alumna de 4to semestre de la Maestría en Ciencias en Biomedicina en la Facultad de Medicina de la UAQ Sede donde se realizará el estudio: Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria (LIOM).

Nombre _____ del _____ participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este proyecto de investigación por las siguientes razones (opcional): -----

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio. Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma del padreo o tutor: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Fecha: _____

c.c.p El paciente. (Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente)