

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Programa Macro de Investigación**

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

Contenido bacteriológico oral en familias portadoras de amelogenesis imperfecta

Directora de Seminario

Dra. Gina M. Murillo Knudsen

Investigadora asociada

Dra. Sandra Silva de la Fuente

Sustentantes del Seminario de Graduación

Firma

- María Fiorella Morera Mora	B04338	_____
- Erick Herrera Briceño	B23260	_____
- Michelle Rojas Leiva	B25851	_____
-Mariel Guevara Montoya	B02857	_____

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes

San José, Costa Rica

Año 2018

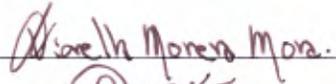
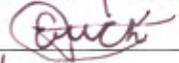
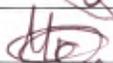
**HOJA DE APROBACIÓN MEMORIA
SEMINARIO DE GRADUACIÓN**

Nombre del proyecto:

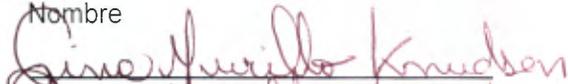
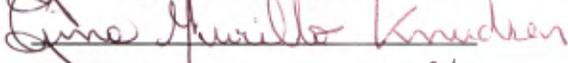
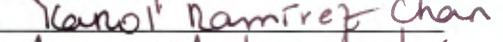
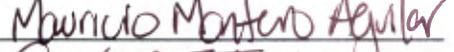
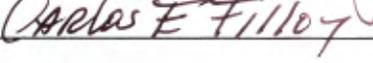
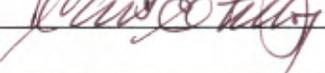
Contenido bacteriológico oral en familias portadoras de amelogenesis imperfecta

Sustentantes

Fecha: 3 de Diciembre del 2018

Nombre	Carné	Firma
- María Fiorella Morera Mora	B04338	
- Erick Herrera Briceño	B23260	
- Michelle Rojas Leiva	B25851	
- Mariel Guevara Montoya	B02857	

Miembros del tribunal

Nombre	Firma
	
	
	
	
	

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Vicerrectoría de Investigación
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información (SIBDI)

Autorización para la digitalización, inclusión y publicación de trabajos finales de graduación (TFG) en el acervo digital del Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información de la Universidad de Costa Rica (SIBDI-UCR).

Los abajo firmantes, en su condición de autores del TFG:

AUTORIZAMOS de forma gratuita al SIBDI-UCR, a digitalizar e incluir dicho TFG en el acervo digital del SIBDI-UCR y a publicarlo a través de la página web u otro medio electrónico, para ser accesado según lo que el SIBDI defina para su consulta o divulgación. Dicho texto se publicará en formato PDF o en el formato que en su momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre y gratuito, permitiendo su consulta e impresión, pero no su modificación. Los autores del TFG, garantizan al SIBDI-UCR que la tesis es el trabajo original que sirvió para la obtención de su título, que no infringe ni violenta ningún derecho de terceros.

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____

Domicilio: _____

Firma _____, Fecha: _____

Para uso interno. Número de tesis: _____

Dedicatoria

Agradezco, primero que todo, a Dios, porque sin él no hubiera logrado nada; le agradezco su infinita gracia, misericordia y amor hacia mí. A mi madre, por ser una mujer tan extraordinaria y valiente, por siempre sacar lo mejor de mí e impulsarme a ser excelente en todo lo que hago. A mis hermanos Silvia y Braulio, por todo el apoyo durante este tiempo y por tenerme tanta paciencia durante todo este proceso. A mis compañeros y amigas de U, que muchas veces sin ustedes no hubiera logrado terminar los incansables días en la facultad. A mis compañeros de proyecto macro, gracias por ser tan esforzados, logramos sacar la tarea. ¡Bendiciones!

MARIEL GUEVARA MONTOYA

Al culminar esta etapa universitaria, la cual estuvo llena de retos, dificultades en el camino que aparecieron, pero también hubo muchas alegrías, grandes lecciones y mucho aprendizaje, agradezco, primeramente, a Dios, por darme la fuerza y el amor por mi carrera. Le agradezco en especial a mi abuela María Luisa, la cual estuvo cada día apoyándome, con todo mi amor te dedico cada logro obtenido, pues no hubiera llegado hasta acá sin tu lucha diaria, sin tu motivación y sin tu infinito amor para conmigo. En fin, agradezco a mi familia y amigos por siempre brindarme su apoyo para salir adelante y poder cumplir un sueño, ser odontóloga.

MARÍA FIORELLA MORERA MORA

El presente trabajo se lo dedico, en primera instancia, a Dios, que me ha dado la fuerza para seguir adelante y lograr cumplir todos mis objetivos. También a mi familia que me ha acompañado siempre y me han apoyado en todo este proceso; a mi novia por estar junto a mí y ser un pilar en mi vida. A las doctoras Gina Murillo y Sandra Silva por guiarnos en el arduo proceso de la realización de este trabajo y despertarnos el interés sobre el tema y la importancia de ver siempre las cosas desde un punto de vista más amplio.

ERICK HERRERA BRICEÑO

Llena de inmensa alegría y sobre todo agradecimiento quiero dedicar este proyecto, en primer lugar, a Dios que ha guiado mi camino, me ha dado la fuerza y perseverancia necesaria para seguir adelante pese a las dificultades. A mis padres que con todos sus consejos, amor y comprensión han sido mi motor en este largo camino. A mis profesoras y compañeros que sin ellos no hubiera sido posible el éxito de este proyecto.

MICHELLE ROJAS LEIVA

Agradecimientos

Agradecemos, primeramente, a Dios, que nos permitió llegar hasta este momento y darnos las fuerzas para poder cumplir con todos los objetivos propuestos en nuestro trabajo.

El presente trabajo fue realizado bajo la supervisión de las doctoras Gina Murillo Knudsen y Sandra Silva De la fuente, a quienes queremos expresarles nuestro más profundo agradecimiento por todo el esfuerzo que han puesto a lo largo de los años en esta línea investigativa como lo es la amelogénesis imperfecta; son dos mujeres excepcionales y sumamente valiosas en el campo de la investigación. Estamos seguros que seguirán cosechando muchos logros como pioneras que son y continuar con el ejemplo para las futuras generaciones como lo han sido para nosotros.

Nos sentimos sumamente retribuidos por formar parte de un trabajo de investigación tan innovador, les agradecemos a las dos por guiarnos y brindarnos todas las herramientas para concluir este trabajo de manera exitosa, por siempre recibirnos con amor y paciencia durante todo este proceso, llevamos grandes lecciones aprendidas y un pedacito de ustedes en nuestros corazones.

Finalmente, sabemos que un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que ofrecen las personas que nos estiman, amigos, familiares. A nuestra amada Facultad de Odontología, por acogernos durante todos estos años de carrera, a los docentes que siempre se han destacado por ser excelentes en su trabajo, por transmitirnos los conocimientos necesarios y motivarnos a ser cada día mejores en nuestra profesión. A todas las asistentes y al personal administrativo, muchas gracias, porque ustedes también son parte de este logro.

Carta de la filóloga

Xinia Segura Portuguez
Filología Española, UCR
Tels. 2245-1705 / 8314-7797
xsegurap@yahoo.com

A QUIEN CORRESPONDA

La suscrita filóloga, carné N.º 46315 de afiliación al Colegio de Licenciados y Profesores en Letras, Filosofía, Ciencias y Artes, hago constar que revisé y corregí la redacción, ortografía, estilo y todo tipo de error de lenguaje de la Memoria de Seminario «**Amelogénesis imperfecta: Contenido bacteriológico oral en familias portadoras de amelogénesis imperfecta**», elaborado por *María Fiorella Morera Mora, Erick Herrera Briceño, Michelle Rojas Leiva y Mariel Guevara Montoya* para optar por el grado académico de licenciatura en Odontología.*****

Extiendo la presente en San José a los veinticinco días del mes de noviembre del año dos mil dieciocho.*****



Licda. Xinia Segura Portuguez

Tabla de Contenido

CAPÍTULO I.....	1
ANTECEDENTES	1
1.1 Justificación	2
1.2 Planteamiento	3
1.3 Objetivos del estudio.....	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Odontogénesis.....	6
2.1.1 Generalidades.....	6
2.1.2 Morfogénesis.....	6
2.2 Amelogénesis	11
2.2.1 Generalidades.....	11
2.3 Amelogénesis imperfecta (AI)	12
2.3.1 Clasificación	13
2.3.2 Patrones de herencia de la AI.....	15
2.3.3 Amelogénesis imperfecta y sus mutaciones conocidas	19
2.4 Dentinogénesis imperfecta	20
2.4.1 Clasificación	21
2.4.2 Dentinogénesis imperfecta tipo I asociada a osteogénesis imperfecta.....	21
2.4.3 Dentinogénesis imperfecta tipo II	22
2.4.4 Dentinogénesis imperfecta tipo III	22
2.4.5 Displasia dentinaria tipo I.....	22
2.4.6 Displasia dentinaria tipo II.....	23
2.5 Dogma central	23
2.5.1 Estructura del ADN y dogma central	23
2.5.2 Dogma central de la biología molecular.....	24
2.5.3 Transcripción	26
2.5.4 Traducción	27
2.6 Microbiota oral.....	29
2.6.1 Mucosa bucal.....	34
2.6.2 Superficies dentarias	35
2.6.3 Surco gingival.....	35

2.6.4 Lengua	36
2.6.5 Materiales artificiales	37
2.7 Microbioma 16 S.....	37
2.7.1 ARNr 16S.....	38
2.8. Daño Molecular: Familias afectadas del presente estudio	40
2.8.1 Genograma I: Familia 001.....	40
2.8.2 Genograma II: Familia 002.....	42
2.8.3 Genograma III: Familia 003.....	45
2.8.4 Genograma IV: Familia 004	46
2.8.5 Genograma V: Familia 005	49
CAPÍTULO III	51
MARCO METODOLÓGICO	51
3. Metodología	52
3.1 Recolección de las muestras	52
3.2 Extracción del ADN a partir del enjuague bucal.....	53
CAPÍTULO IV	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
4.1 Caracterización de las bacterias en familias con amelogénesis imperfectas: 2018.....	64
4.2 Características de las familias.....	64
4.3 Características de los géneros de bacterias	65
4.2 Discusión.....	71
CAPÍTULO V	75
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
5.1 Conclusiones.....	76
5.2 Recomendaciones	77
Referencias bibliográficas.....	78
Anexos	83

Lista de Tablas

Tabla 1. Resumen de algunos de los genes identificados en la patogénesis de la AI, así como sus respectivos loci.....	17
Tabla 2. Microbiota oral en diferentes enfermedades	32
Tabla 3. Tabla IUPAC de código nucleótidos.....	55
Tabla 4. Volúmenes para la reacción de amplificación	55
Tabla 5. Set de índices	58
Tabla 6. Volúmenes para reacción de PCR	59
Tabla 7. Hoja de trabajo para el equipo utilizado.	62
Tabla 8. Información de familias en estudio	65
Tabla 9. Presencia y orden de abundancia según género de bacteria	66
Tabla 10. Asociación entre familias y entre los afectados y no afectados con AI	67
Tabla 11. Presencia y orden de abundancia según especie de bacteria	68
Tabla 12. Asociación entre afectados y no afectados	70

Lista de Figuras

Figura 1. Estadios en la formación dental y factores involucrados	10
Figura 2. Ciclo de vida de los ameloblastos.....	12
Figura 3. Amelogénesis imperfecta tipo hipoplásico (izquierda). De aspecto clínico poroso, áspero y agrietado (centro). Con coloración blanquecina-plomiza opaca (derecha).....	13
Figura 4. Amelogénesis imperfecta tipo hipomaduración. Con superficies de color amarillenta (izquierda). Con superficies de color marrón (centro). Amelogénesis imperfecta tipo hipomineralización (derecha)	14
Figura 5. Amelogénesis imperfecta tipo hipoplasia e hipomaduración con taurodontismo. Radiográficamente, las primeras molares evidencian cámaras pulpares amplias y alargadas. (izquierda). Clínicamente, se observa alteración en formación del esmalte (derecha).....	15
Figura 6. Amelogénesis imperfecta de un incisivo lateral permanente	19
Figura 7. Esquema dogma central de la biología molecular	25
Figura 8. Replicación del ADN.....	26
Figura 9. Transcripción del ADN.....	26
Figura 10. Subunidad pequeña y grande ribosomal	27
Figura 11. Intrones y exones en la transcripción del ADN	28
Figura 12. Ribosoma bacteriano.....	38
Figura 13. Estructura ARNr 16S	39
Figura 14. Genograma Familia 001	40
Figura 15. Fotos intraorales sujeto 01	41
Figura 16. Genograma Familia 002	42
Figura 17. Fotos Intraorales.....	43
Figura 18. Genograma Familia 003	45
Figura 19. Fotos intraorales.....	45
Figura 20. Genograma Familia 004	46
Figura 21. Fotos intraorales.....	47
Figura 22. Genograma Familia 005	49
Figura 23. Fotos intraorales.....	49
Figura 24. Biblioteca de Secuencias Metagenómicas 16S	57

Resumen

Antecedentes: La amelogénesis imperfecta (AI) es un grupo de desórdenes hereditarios en donde se presenta un cuadro clínico genéticamente heterogéneo con manifestaciones clínicas y radiográficas que afectan principalmente el esmalte dental. Las distintas variantes de AI se clasifican, generalmente, según el defecto y varían entre hipoplasias, hipocalcificaciones e hipomaduraciones. El presente fue un estudio descriptivo transversal donde se muestrearon 16 sujetos de familias costarricenses portadoras de AI, con miembros afectados y no afectados, cuyo objetivo fue analizar las variaciones en la colonización microbiológica oral bacteriana para incrementar el conocimiento en este tema, ya que la información es escasa actualmente.

Metodología: El estudio de casos incluyó cinco familias costarricenses portadoras de AI con 7 miembros afectados y 9 no afectados, con diferentes mutaciones genéticas reportadas. Se realizó una toma de muestras de saliva por medio de un enjuague bucal, con el fin de coleccionar las bacterias orales. Mediante el sistema de secuenciación de próxima generación, MiSeq de Illumina, se realizó un análisis de las regiones V3-V4 del gen ribosomal 16S bacteriano, con el fin de determinar y comparar la comunidad bacteriana oral entre individuos afectados, no afectados y entre las familias.

Resultados: Se clasificó un promedio de 333 géneros de bacterias sin que se encontrara diferencia estadísticamente significativa entre los afectados y los no afectados ($p = 0,895$) ni entre las familias ($p = 0,965$); un 9 % de los géneros no se clasificaron, independientemente de la afectación ($p = 0,149$) ni entre las familias ($p = 0,118$). Con respecto a las especies se clasificó un promedio de 482 en las que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre afectados y no afectados ($p = 0,669$) ni entre las familias ($p = 0,922$); el 35 % de las especies no se clasificaron.

Conclusiones: En el análisis de la secuenciación del ADN (microbioma 16S) de cada una de las muestras de los sujetos de estudio, se logró identificar mayor abundancia y prevalencia, en orden descendiente, de bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Gemella* y *Rothia*, figurándose entre las ocho más sobresalientes. Se identificó que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) del contenido bacteriológico entre pacientes afectados, presentándose similitud entre abundancia y prevalencia de las comunidades bacterianas.

Estudiantes de la maestría en Bioinformática desarrollan un análisis bioinformático complejo en el que incluirán, además de los datos del microbioma, los metadatos de los participantes.

Palabras clave: Amelogénesis imperfecta, microbioma 16S, microbiota oral bacteriana

CAPÍTULO I
ANTECEDENTES

1.1 Justificación

La amelogénesis imperfecta (AI) es un término que define un cuadro clínico genéticamente heterogéneo con manifestaciones clínicas y radiográficas, donde la estructura adamantina es de pobre desarrollo o ausencia completa del esmalte, lo que genera que este se torne más quebradizo con partes de estructura dental que no están recubiertas por este tejido y provoca sensibilidad e incomodidad para las personas que lo padecen tanto física como emocional. Por ello nace la necesidad de investigar diferentes aspectos de esta condición para incrementar su abordaje tal como la microbiota oral, lo que incrementará el conocimiento relacionado con la AI en la comunidad científica y profesional.

El primer proyecto formal en Costa Rica, con miras a profundizar sobre la amelogénesis imperfecta, inició en el año 2011, conducido por la Dra. Gina Murillo Knudsen de la Universidad de Costa Rica en colaboración con el Dr. Alan Mighell de la Universidad de Leeds de Inglaterra. Las etapas iniciales del proyecto documentan diferentes tipos de lesiones de tejidos mineralizados y, posteriormente, se reclutan familias costarricenses afectadas por esta condición. El proyecto se inscribe y aprueba en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica con el número 440-B2-334.

La microbiota oral es la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten nuestro espacio corporal. La investigación en este tema es de gran relevancia, pues no ha sido anteriormente relacionado con la condición de amelogénesis imperfecta y su estudio será de gran valor, ya que permitirá entender la condición desde una perspectiva de análisis de microorganismos orales y el comportamiento de la microbiota oral en superficies que carecen de esmalte.

El presente seminario de graduación se enfocó en el estudio del ribosoma procariota, más específicamente en la subunidad 30S, la cual contiene la molécula de ARNr 16S y está siendo muy utilizada actualmente para obtener taxonomía y filogenia de las especies bacterianas.

Por medio del ARN de las bacterias, ARNr 16S, que se tomó de las muestras de las familias participantes del proyecto y procesaron en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), se logró, de acuerdo con las bases de datos, un análisis comparativo en cuanto a su genoma completo. Además, se conoció y cuantificaron las especies bacterianas en las muestras analizadas. Por lo tanto, con los resultados se pudo conocer la microbiota oral entre los sujetos afectados y no afectados.

La microbiota oral varía en cada persona. En el presente estudio se contó con familias costarricenses donde la condición de amelogénesis imperfecta se expresa en varios de sus miembros y en otros no. El fenotipo dental de cada familia en su condición particular de AI puede permitir el alojamiento de microorganismos distintos a los encontrados en un individuo que no presente la condición y con un esmalte de estructura bien mineralizada. En algunas de las familias participantes se ha logrado identificar la mutación genética específica, en particular la ameloblastina y la amelotina (47-48) como hallazgos nuevos a nivel mundial, lo cual contribuye en gran escala a comprender esta condición y su entorno relacionado con el tejido formado en la superficie dental.

En este seminario se documentaron familias costarricenses identificadas con amelogénesis imperfecta en miembros afectados y no afectados, cuyo propósito será analizar las variaciones en la colonización microbiológica oral para incrementar el conocimiento en este aspecto y cuya información es escasa; sobre todo el nivel de higiene oral en individuos afectados y no afectados, lo que puede contribuir al soporte en mejorarla y disminuir factores que podrían afectarla como la sensibilidad dental y la superficie de tejido no bien formado de las piezas dentales.

1.2 Planteamiento

¿Existirá una variación en la microbiota oral de individuos afectados y no afectados de amelogénesis imperfecta dentro de una misma familia?

¿Este comportamiento se reproduce en todas las familias analizadas?

1.3 Objetivos del estudio

1.3.1 Objetivo general

- Analizar el contenido bacteriológico oral en miembros afectados y no afectados de familias costarricenses que presentan amelogénesis imperfecta para determinar diferencias en la colonización bacteriana oral entre ellos.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el contenido de la microbiota oral de los participantes afectados y no afectados.
2. Comparar el contenido bacteriológico entre los afectados y no afectados.
3. Verificar si el comportamiento de las comunidades bacterianas es variable entre los miembros de una misma familia.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1 Odontogénesis

2.1.1 Generalidades

El desarrollo de la cara y de la cavidad bucal comienza en la cuarta semana de vida intrauterina. El primer arco branquial, al comienzo de la cuarta semana, se bifurca lateralmente y hacia abajo, para formar los mamelones maxilares por arriba y los mandibulares por abajo, procesos fundamentales en la formación de la cara y de la boca.

Los mamelones maxilares quedan a ambos lados del estomodeo y los mandibulares forman su borde inferior (1).

2.1.2 Morfogénesis

El estomodeo queda limitado cefálicamente por el proceso frontonasal, en su porción caudal por el proceso mandibular y lateralmente por los procesos maxilares. En la formación de la cavidad oral participa el estomodeo (con su cubierta de ectodermo) y el intestino anterior (con su cubierta de endodermo), regiones que quedan en comunicación tempranamente el día 24, cuando se perfora la membrana bucofaríngea. Antes de en la tercera semana, surge un brote ectodérmico desde el techo del estomodeo, la bolsa de Rathke, que crece hacia cefálico, pasando a través de la base de cráneo en formación; elemento que dará origen a la adenohipófisis (1).

Por sobre el estomodeo se están desarrollando las fositas nasales que, temporalmente, se encuentran separadas de este por la membrana buconasal; la ulterior perforación de esta membrana, durante la sexta semana, pondrá en comunicación estas cavidades a través de las coanas primitivas. A esta edad, el pequeño piso de las fosas nasales o el pequeño techo de la cavidad oral, según por donde se mire, corresponde a una extensión profunda de los procesos nasales mediales que se han fusionado para formar el paladar primitivo.

En consecuencia, la zona inferior de los procesos nasales mediales, flanqueados por los procesos maxilares, dan origen a la zona media del labio superior (componente labial, que forma el surco nasolabial), la zona anterior del reborde alveolo dentario (componente maxilar, que contiene a los cuatro incisivos superiores) y la región anterior del paladar óseo (componente palatino); toda esta región se conoce como segmento intermaxilar o premaxilar, elemento que establece una continuidad hacia cefálico con el tabique nasal proveniente del proceso frontonasal. En este momento, la porción anterior de la lengua en desarrollo contacta con el paladar primitivo, mientras que la zona posterior de ella se proyecta hacia la cavidad nasal.

Hacia la séptima semana comienza a establecerse la separación definitiva entre fosas nasales y cavidad oral; cierre que se realiza a partir de los procesos maxilares desde donde surgen las crestas palatinas o procesos palatinos laterales (1)

2.1.2.1 Desarrollo y formación del patrón coronario y radicular

El desarrollo de los dientes inicia alrededor de la sexta semana y es uno de los factores, junto con el desarrollo de los maxilares superior e inferior y de los senos paranasales, que van a contribuir a la estructuración de la morfología de la cara (2).

La formación de los dientes es un proceso coordinado de interacción entre los que van a dar origen a la dentina y al esmalte. Toda la regulación de la formación del patrón dental de todas las piezas dentarias está organizada por la expresión combinada de diferentes genes Hox por la mesénquima. En el desarrollo específico del diente el epitelio realiza su diferenciación mediante diferentes factores de crecimiento como Wnt, proteínas morfogenéticas del hueso BMP, factores de crecimiento fibroblástico FGF y factores Shh y factores de transcripción MSX-1 y 2 (2).

Debido a su elevado contenido en sales minerales y a su disposición cristalina, el esmalte es el tejido calcificado más duro del cuerpo humano. Su función específica es formar una cubierta resistente para los dientes que los adecúa para la masticación (3).

Clásicamente se describe este fenómeno según un esquema de cuatro etapas sucesivas, el cual comienza con la diferenciación de las yemas epiteliales que se forman por la profundización y proliferación del epitelio de la lámina dental en la mesénquima subyacente y en el lugar que ocuparán los futuros órganos dentales. Luego, pasa por la constitución de los órganos en casquete y campana, concluye con la morfogénesis de los folículos en el seno donde se elaboran los tejidos dentarios (4).

Específicamente el proceso de formación dental está conformado por tres etapas.

1. *Etapa de botón, brote o yema*: Después de la sexta semana de vida intrauterina, se realiza un engrosamiento de la capa epitelial, por la proliferación de algunas células de la capa basal. Esto se conoce como lámina dental y es el precursor del órgano del esmalte. Después, en cada maxilar se presentan diez engrosamientos redondeados dentro de la lámina dental, que son los futuros gérmenes dentales. La etapa de yema, es una etapa fugaz que se aprecia en la zona de la lámina dental respecto a cada diente, un abultamiento en forma de disco que constituirá las yemas epiteliales. La mesénquima subyacente en contacto con la yema presenta una condensación esférica de células mesenquimatosas que evolucionará para constituir la papila dental (5).

2. *Etapa de casquete o sombrero*: La división celular rítmica origina una proliferación del epitelio. La superficie profunda del botón comienza a invaginar y varias capas se hacen visibles. Estas son el epitelio dental interno, que es una capa de células epiteliales altas a nivel de la concavidad, y el epitelio dental externo, que es una capa sencilla de células epiteliales cortas sobre la superficie exterior. En el centro se separan las células por aumento del líquido intercelular mucoso y se conocen como retículo estrellado u órgano dental. La proliferación epitelial se fija a la lámina dental por un tramo de epitelio que sigue creciendo y proliferando hacia el tejido conjuntivo. Alrededor de la octava semana de vida intrauterina, se observa el primer esbozo de la papila dental. Esto corresponde a la condensación del tejido conjuntivo bajo el epitelio dental interno, que más tarde se convierte en la pulpa dental.

En un principio, las células de la papila dental son grandes y redondeadas o poliédricas, con citoplasma pálido y núcleo grande. Al mismo tiempo, se condensa la mesénquima, que rodea el exterior del diente en desarrollo y se torna más fibroso, este tejido se llama saco dental. Las células del saco dental formarán los tejidos del periodonto, que son el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. En la etapa de casquete quedan diferenciadas algunas estructuras como el órgano dental epitelial, la papila y el saco dental, responsables de la formación de todos los tejidos del diente y del tejido periodontal; comienza la histodiferenciación del órgano dental.

En su parte cóncava se forma el epitelio adamantino interno en el que las células cuboideas se transforman en cilíndricas, y en la porción convexa del casquete se forma el epitelio adamantino externo en donde dichas células no cambian su forma; además, el retículo estrellado a consecuencia de la segregación de glicosaminoglicanos por las células poliédricas centrales del órgano dental (5).

3. *Etapas de campana*: Se profundiza la invaginación y ocurre una serie de interacciones entre las células epiteliales y mesenquimatosas que originan diferenciación de las células del epitelio dental interno en otras llamadas ameloblastos, quienes contribuyen a formar el esmalte. Las células de la papila dental, ubicadas debajo de los ameloblastos, se diferencian en odontoblastos, que son los que elaboran la dentina. Varias capas de células escamosas de poca altura empiezan a surgir junto al epitelio dental interno, estas capas se denominan estrato intermedio. La formación de la raíz no comienza hasta que la formación del esmalte de la corona finaliza. En la zona de reflexión de los epitelios adamantinos interno y externo, desprovista de esmalte, se forma el muñón epitelial de la raíz que prolifera, penetrando en profundidad y preforma el esbozo de la futura raíz dental.

En la etapa de campana se establecen los patrones coronarios de cúspides bordes y fisuras. Se desarrolla el estrato intermedio entre el retículo estrellado y el epitelio adamantino interno, el cual es esencial en la formación del esmalte al producirse los materiales que pasan a los ameloblastos y a la matriz del esmalte durante la amelogénesis. El retículo estrellado se expande por aumento de la sustancia

intercelular. Al final de esta etapa el epitelio adamantino externo se dispone en pliegues en los que penetran proyecciones del saco dental que proporcionan vasos capilares al órgano del esmalte durante la amelogénesis; se produce la diferenciación de los ameloblastos y de los odontoblastos (3).

Por la influencia organizadora de las células del epitelio adamantino interno, las células de la papila dentaria se diferencian en odontoblastos, mientras que las cilíndricas originarán a los ameloblastos. La papila dental en su evolución posterior formará la dentina y la pulpa. El saco dental adopta forma circular y formará el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar propio. En el último estadio se pierde la continuación del órgano dental donde la lámina y el saco dental rodeará completamente al germen dentario.

Cuando la diferenciación de los tejidos del germen alcanza su nivel máximo se inicia la formación de los tejidos mineralizados. Esta nueva etapa la reconocen numerosos autores como etapa de folículo dentario, aunque otros solo la consideran como una etapa avanzada de la campana (3).

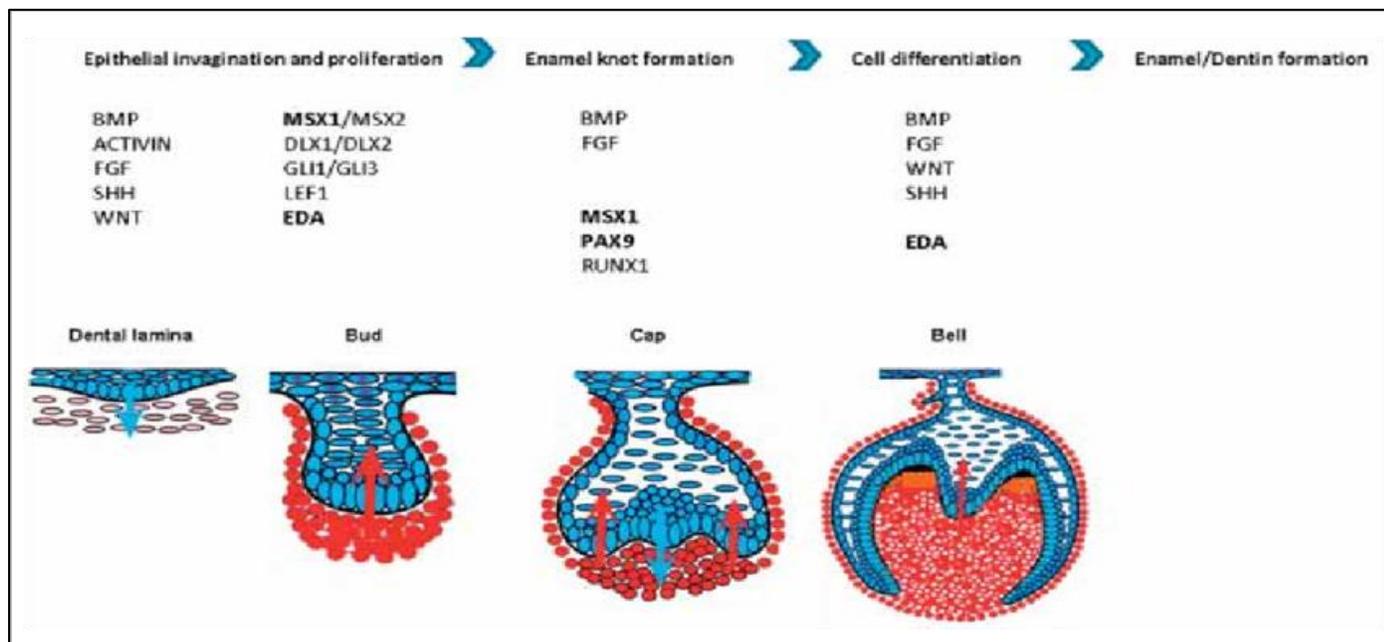


Figura 1. Estadios en la formación dental y factores involucrados

Fuente: Katerine C. & Auerkari, E. Molecular genetics of craniosynostosis. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2018. doi: 10.1088/1755-1315/130/1/012037.

2.2 Amelogénesis

2.2.1 Generalidades

Fases de la amelogénesis

- Elaboración de una matriz orgánica extracelular
- Mineralización: formación, elongación y nucleación de los cristales, remoción de la matriz orgánica y maduración de los cristales (6)

1. Etapa morfogénica
2. Etapa de diferenciación: empiezan a tomar forma los ameloblastos, hay una inducción de las células hacia el tejido conectivo para diferenciarse en odontoblastos.
3. Etapa de secreción: el ameloblasto ha perdido la capacidad de dividirse y se da la segregación del esmalte aprismático. Se desarrolla el proceso de Tomes.
4. Etapa de maduración: ameloblastos reducen el diámetro, ya hay una importante deposición de esmalte. Desaparece el proceso de Tomes.
5. Etapa de protección: el esmalte ya está completamente mineralizado, el ameloblasto entra en un estado de regresión, se fusionan con el estrato intermedio. Protege al esmalte formado del tejido conectivo hasta la erupción del diente.
6. Etapa demolítica: el epitelio reducido del esmalte prolifera y provoca la atrofia del tejido conectivo que lo separa del epitelio bucal y une ambos epitelios provocando la correcta erupción del órgano del esmalte (7).

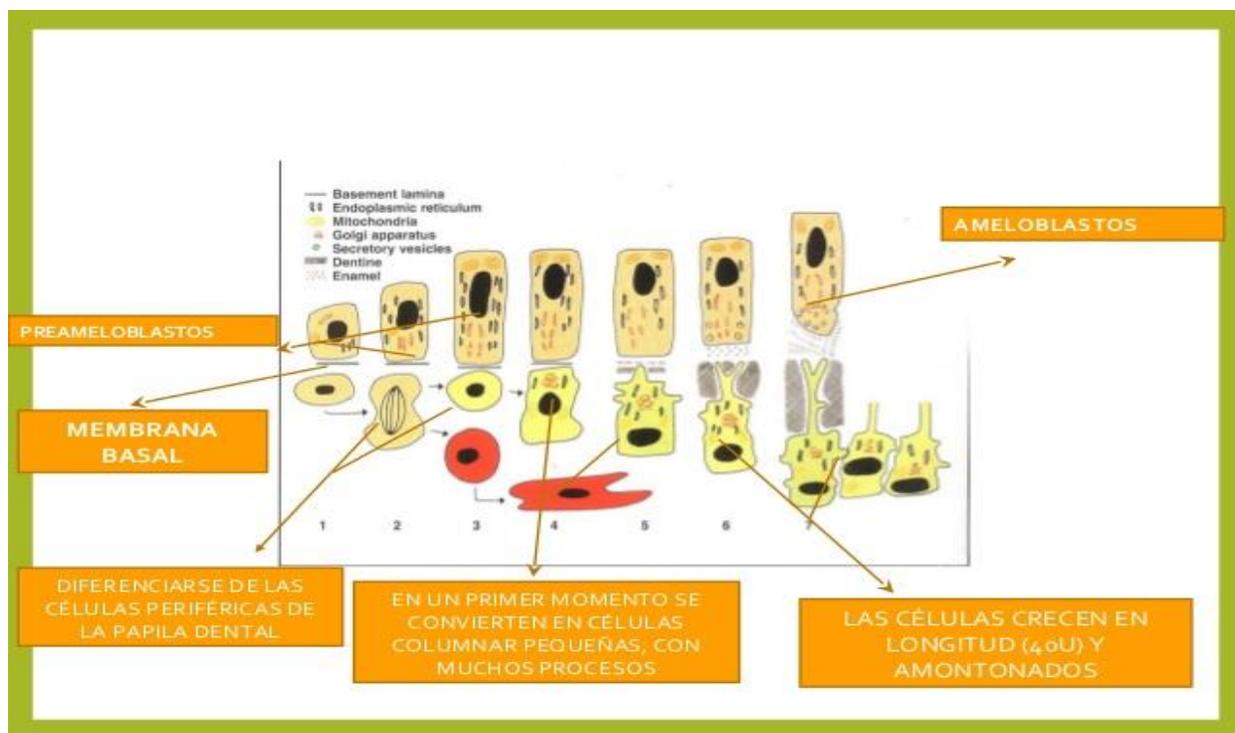


Figura 2. Ciclo de vida de los ameloblastos

Fuente: Layana A. Dentinogénesis. (En línea) (Fecha de acceso el 16-04-2018) Disponible en: <https://es.slideshare.net/AllisonLayanaBernal/dentinogenesis-28219303>

2.3 Amelogénesis imperfecta (AI)

Según lo estudiado se encuentra que la amelogénesis imperfecta (AI) es una variación del esmalte con manifestaciones clínicas, radiográficas y alteraciones genéticas donde la estructura adamantina es de pobre desarrollo o ausencia completa del esmalte, causado por la diferenciación impropia de los ameloblastos (8).

La amelogénesis imperfecta (AI) es una anomalía estructural del esmalte dental, la cual se debe a una función anormal de los ameloblastos o a una alteración en el depósito estructural y la calcificación de la matriz del esmalte, causando una alteración en el grado de mineralización de las piezas dentales (9).

2.3.1 Clasificación

La AI consta de varias clasificaciones que dependen de características clínicas y etapas de desarrollo de la pieza dental. Si la alteración histológica se produce durante la formación de la matriz del esmalte, el resultado será una hipoplasia; si se presenta durante la etapa de aposición (calcificación y mineralización), se producirá una hipocalcificación; y si ocurre durante la segunda fase de la etapa de aposición (maduración), resulta una hipomineralización (9).

Lesiones de tipo hipoplásico: se caracterizan por presentar una cantidad insuficiente de esmalte dental, como consecuencia de la inhibición de ameloblastos o ausencia del epitelio del órgano del esmalte, lo cual evita la histodiferenciación del ameloblasto. El esmalte puede ser áspero o liso y brillante (Figura 3). Respecto a la corona dental, se da una disminución del tamaño y son frecuentes los diastemas, pérdida de dimensión vertical, también se puede dar sensibilidad dentaria. Radiográficamente, se observa una forma cuadrada de las coronas y cúspides bajas o ausentes. La radiodensidad del esmalte se presenta normal (10).



Figura 3. Amelogénesis imperfecta tipo hipoplásico (izquierda). De aspecto clínico poroso, áspero y agrietado (centro). Con coloración blanquecina-plomiza opaca (derecha)
Fuente: Gonzales Pinedo, CO., Miguel del Priego, GP. (2009).

Lesiones hipomineralizadas: se subdividen en hipocalcificadas e hipomaduras. La alteración de hipocalcificadas se da en la fase de calcificación de la matriz orgánica, por lo cual el esmalte dental no se afecta en grosor, pero al calcificarse será frágil y se desprenderá fácilmente.

La alteración de las hipomaduras se da durante el proceso de maduración del esmalte en la fase final de la amelogénesis y tampoco afecta el grosor del esmalte, pero el contenido mineral y la radiodensidad estarán disminuidos.

Por lo tanto, en los dos casos anteriores se tienen piezas dentales que se fracturan o desgastan fácilmente y son proclives a la desintegración poseruptiva. El color puede variar entre un blanco opaco a un amarillo-café más profundo y pigmentarse por factores extrínsecos (Figura 4). Con el tiempo las coronas presentan forma y volumen anormal. Radiográficamente, existe falta de contraste en la radiodensidad entre el esmalte y la dentina, el grosor del esmalte es normal en dientes no erupcionados (9).



Figura 4. Amelogenesis imperfecta tipo hipomaduración. Con superficies de color amarillenta (izquierda). Con superficies de color marrón (centro). Amelogenesis imperfecta tipo hipomineralización (derecha). Fuente: Gonzales Pinedo, CO., Miguel del Priego, GP. (2009).

Hipomaduro-hipocalcificado asociado a taurodontismo: Esta es una combinación de ambas, con el peor pronóstico al combinar disminución en el grosor del esmalte con pérdida de dureza y cámaras pulpares grandes, lo cual aumenta la probabilidad de pulpitis (9). Suele manifestarse en ambas denticiones, al examen radiográfico (panorámica y periapical), se evidencian cámaras pulpares amplias y alargadas en los primeros molares permanentes (Figura 5).

Generalmente estos pacientes presentan anomalías en el cabello y en los huesos, un denso hueso cortical y uñas displásicas evidenciándose en la infancia, pero perdiéndose en la adolescencia. Algunos autores señalan que este tipo de AI suele presentar una mutación en los genes DLX3 y DLX7 donde se ve perturbado la formación del esmalte (10).

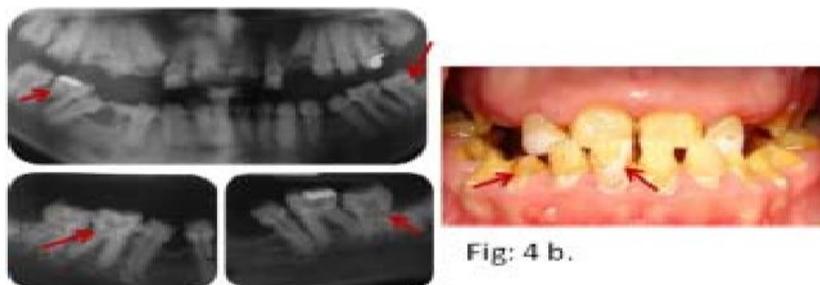


Figura 5. Amelogénesis imperfecta tipo hipoplasia e hipomaduración con taurodontismo. Radiográficamente, las primeras molares evidencian cámaras pulpares amplias y alargadas. (izquierda). Clínicamente, se observa alteración en formación del esmalte (derecha)
Fuente: Gonzales Pinedo, CO., Miguel del Priego, GP. (2009).

La AI se clasifica clínicamente en dos grandes grupos: lesiones hipoplásicas y lesiones hipomineralizadas. El primer grupo se caracteriza por la presencia de piezas con zonas sin esmalte dental, producto de la ausencia del epitelio interno en el órgano del esmalte, por lo cual en la fase de histodiferenciación no se formarán los ameloblastos (9).

2.3.2 Patrones de herencia de la AI

El primero que se da es la autosómica dominante, en la cual para que la enfermedad se exprese basta tener solo un gen mutado en cualquiera de los 22 cromosomas y en este patrón la alteración se presentan individuos afectados en todas las generaciones.

En la AI autosómica dominante la alteración ocurre en el gen de la enamelinina (ENAM), localizado en el cromosoma 4q21, y es la responsable de iniciar la mineralización de los cristales en las primeras etapas de la amelogénesis (11).

La autosómica recesiva, donde se puede heredar, por ambos padres, una copia del gen mutado; aquí normalmente no se muestran signos ni síntomas de la enfermedad. Para la AI autosómica recesiva la alteración se produce en el gen de la enamelinina (MMP20), que participa con la amelogenina en la etapa secretora y en el gen de la calicreína (KLK4), responsable de eliminar proteínas de la matriz para permitir el crecimiento final de los cristales en la maduración.

Las mutaciones en estas proteínas se asocian con AI hipomadura e hipomadura pigmentada, caracterizada por un esmalte de espesor normal y menor contenido mineral, los dientes presentan pigmentaciones de color amarillo-café. En la radiografía, el esmalte menos radiopaco muestra poco contraste con la dentina (12).

La ligada al cromosoma X donde el gen mutado que causa el trastorno se encuentra en este mismo, esta alteración se da más en varones. Las AI ligadas al cromosoma X se asocian a mutaciones en el gen de la amelogenina. Los errores de codificación originan cambios en los dominios y funciones de la proteína, determinando diversas manifestaciones clínicas que involucran déficit en la cantidad de esmalte (hipoplasia) o defectos en su mineralización (hipomaduración). También existe variación entre géneros, los pacientes masculinos solo expresan un alelo mutado, en cambio las mujeres muestran un patrón de mosaicos de expresión (11).

Por último, la mutación de novo, también llamada espontánea (13), es aquella que se produce por una causa desconocida es la primera mutación determinada en una familia. Se encuentran, generalmente, en padres sanos y en ausencia de antecedentes familiares (9).

Estudios epidemiológicos anteriores de Backman y Holmgren (1988) constatan 51 familias suecas para identificar la segregación de AI y revelaron que el 6 % de los casos estaban ligados al cromosoma X, el 63 % se debían a un patrón autosómico dominante y el 12 % a las formas autosómicas recesivas de AI; el 19 % fueron casos esporádicos donde no existían antecedentes familiares que permitieran establecer un patrón de herencia (9).

El avance en el conocimiento de la base molecular de la AI ha estado limitado por su diversidad genética y escasa prevalencia. Dado los costos del diagnóstico genético, no es posible aplicarlo en clínica de forma rutinaria. Sin embargo, actualmente, se están estableciendo correlaciones fenotipo-genotipo con fines investigativos, por medio del estudio clínico y genético-molecular de familias afectadas (12).

Tabla 1.

Resumen de algunos de los genes identificados en la patogénesis de la AI, así como sus respectivos loci

Herencia	Gen	Locus	Clínica	Prevalencia
AD	FAM83H	8q24,3	Hipocalificado	1:15 000
	DLX3	17q21.3-q22	Hipopláxico Hipomaduración	1:15 000
AD	ENAM	4q21	Hipopláxico	1:15 000
AR	(Enamelina) 4q13.3			
AR	KLK4 (Calicreina)	19q13.2	Hipomaduración	1:15 000
	MMP20 (Enamelisina)	11q22.3-q23		
	WDR72 (beta proper)	15q21.3		
Ligado al X	AMELX (amelogenina)	Xp22.3-p22.1	Hipopláxico Hipomadura	Varía entre 1:14 000- 1:700
	Cromosoma X	(Xq22-q28)	Hipopláxico	1:15 000

Fuente: Bloch-Zupan, A., Sedano, H. & Scully, C. (2012). Dento/Oro/Craniofacial Anomalies and Genetics. USA: Elsevier.

Se debe tener presente que las diferentes presentaciones clínicas no son exclusivas de un patrón de herencia específico, por lo que el análisis genético molecular es la única vía para obtener un diagnóstico definitivo (9).

El gen enamelina (ENAM) está implicado en la patogénesis de la AI tanto en la forma dominante como recesiva y se ha mapeado un locus en el cromosoma 4q11-q21. Por el contrario, el locus 4q13.3 ha sido identificado en asociación con la herencia autosómica recesiva (9).

Los procesos de biomineralización de los seres vivos implican la saturación de una matriz extracelular orgánica mediante la precipitación y cristalización de iones de calcio y fosfato entre otros. La mineralización es regulada por diferentes genes para tres proteínas principales del esmalte (amelogenina, ameloblastina, enamelina), dichas proteínas son reconocidas como SCPP (*Secretory Calciumbinding Phospho Protein*) (14).

Para el caso del esmalte, las amelogeninas son un grupo de estas proteínas hidrófobas, reguladas por los genes AMELX Xq22 y AMELY Yp11, ricas en prolina, histidina y glutamina, que constituyen el 90 % de las proteínas matriciales extracelulares secretadas por el ameloblasto (14).

Las amelogeninas tienen la función de controlar la mineralización de la matriz extracelular y regular el crecimiento, orientación y tamaño de los cristales de hidroxiapatita, a partir de la acción de las enamelinas (10 % de las proteínas matriciales extracelulares secretadas, ricas en ácido glutámico y aspártico, serina y glicina), encargadas de regular la iniciación de la mineralización de esmalte (14).

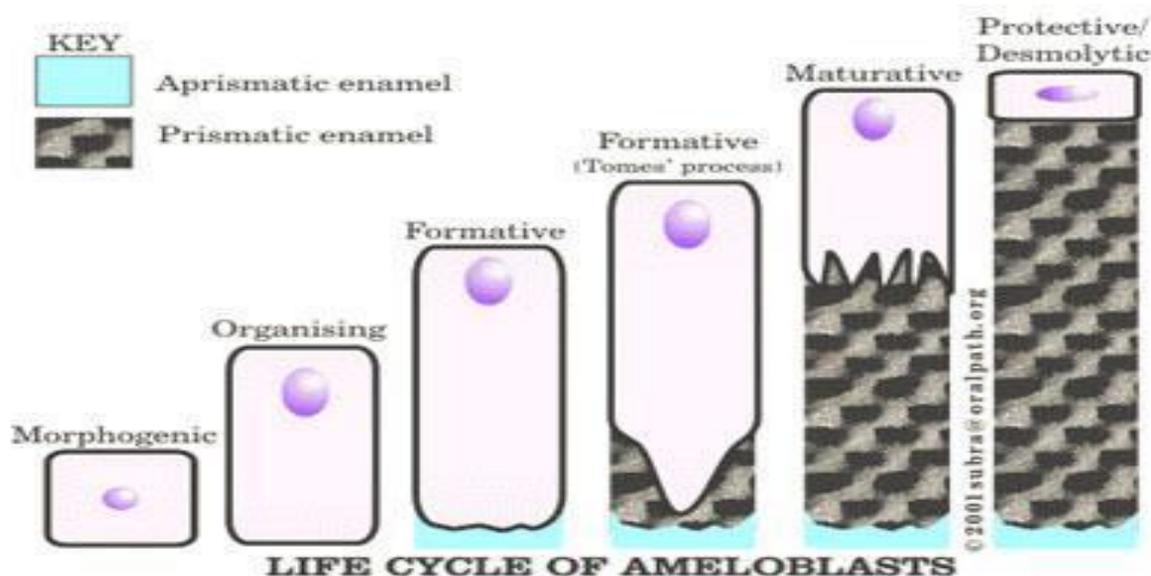


Figura 6. Amelogénesis imperfecta de un incisivo lateral permanente

Fuente: Díaz, E., González, D., Sáez, S., Bellet, L. (2009). Amelogénesis imperfecta de un incisivo lateral permanente. A propósito de un caso. *Revista Odontológica de Especialidades*. Recuperado de http://www.infomed.es/rode/index.php?option=com_content&task=view&id=209&Itemid=1

2.3.3 Amelogénesis imperfecta y sus mutaciones conocidas

Se han realizado diversos estudios de gran relevancia en los que colaboran y realizan un gran aporte investigadoras costarricenses como las doctoras Gina Murillo y Sandra Silva acerca de mutaciones en proteínas presentes en la formación dental, asociadas con amelogénesis imperfecta (AI). Por ejemplo, el estudio que asocia la eliminación de los exones 5 y 6 de la ameloblastina con AI. La ameloblastina (AMBN) es la segunda proteína de la matriz del esmalte que se expresa más abundantemente durante la amelogénesis; su papel fundamental en esta se ha confirmado experimentalmente utilizando modelos en ratones (15).

En dicho estudio se efectuó una secuenciación del exoma en una familia costarricense consanguínea con AI hipoplásica generalizada presente tanto en dentición primaria como secundaria y se identifica la eliminación genómica del exón 6 en la ameloblastina, esto corresponde a la eliminación de 79 aminoácidos, acortando la proteína de 447 a 368 residuos y haciendo que la misma no sea funcional.

Asimismo, se llevó a cabo otra investigación de gran relevancia, en la cual se estudió la eliminación de los exones 3-6, pero esta vez de la proteína amelotina, la cual es una proteína secretada, que actúa como un promotor de la mineralización de la matriz en la etapa final del desarrollo del esmalte y se expresa fuertemente, casi exclusivamente, en los ameloblastos de la etapa de maduración (16).

En dicho estudio también se realizó una secuenciación completa del exoma de una familia costarricense, la cual presenta AI de tipo hipomineralizada y se identificó la deleción genómica que abarca los exones 3-6 de la amelotina. Con esto se da una eliminación de 92 aminoácidos, reduciendo la proteína de 209 a 117 residuos y afectando en gran medida la proteína.

Y por último, un estudio en el cual se investiga acerca de las mutaciones bialélicas de la FAM20A, la cual es parte de una familia de tres proteínas homólogas la FAM20A, B y C conocida como la familia de la serina quinasa, implicadas en la biomineralización. Las mutaciones bialélicas FAM20A causan dos afecciones en las que la amelogénesis imperfecta (AI) es la característica principal: amelogénesis imperfecta, síndrome de fibromatosis gingival y síndrome renal del esmalte. Un fenotipo oral distintivo se comparte en ambas condiciones (17). Se realiza la secuenciación de Sanger de FAM 20A en casos con ese fenotipo y se identifican dos probando, con mutaciones heterocigóticas individuales, que son patógenas.

2.4 Dentinogénesis imperfecta

Cuando sucede alguna alteración en el ADN humano también puede verse afectada la parte dental, por lo que en este caso se hará referencia a la formación de dentina y cómo se ve afectada.

La dentinogénesis imperfecta es hereditaria, autosómica dominante y es una estructura anormal de dentina que puede afectar o no ambas denticiones.

El odontoblasto es la célula que secreta dentina junto con otras proteínas no colágenas, proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), la sialoproteína dentinaria (DSP) y la fosfoproteína dentinaria (DPP) que intervienen en la mineralización, controlando la iniciación y el crecimiento de los cristales de hidroxapatita y regulando la dentinogénesis (18).

2.4.1 Clasificación

Shields clasificó los trastornos genéticos hereditarios de la dentina en dos grupos (19):

- La dentinogénesis imperfecta (DI), con los tipos I, II, y III, y
- La displasia dentinaria (DD), con los tipos I y II.

La dentinogénesis imperfecta tipo I es la manifestación dental de la osteogénesis imperfecta, una enfermedad ósea de herencia autosómica dominante. La DI-II, la DI-III, la DD-I y la DD-II se presentan de forma aislada, no sindrómica, con diferentes fenotipos dentales, siendo su herencia más frecuente la autosómica dominante (18).

Las tres tipos DI-II, DI-III y DD-II han sido mapeadas en el cromosoma 4q21, siendo su factor causal una mutación en el gen que codifica la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP), pero en la DI-I no está relacionado con el gen DSPP (19).

2.4.2 Dentinogénesis imperfecta tipo I asociada a osteogénesis imperfecta

Es la manifestación que se observa en los pacientes con osteogénesis imperfecta, que es una enfermedad de los huesos de herencia autosómica dominante. Sus manifestaciones son idénticas a las de la DI-II y, además, presente debido a la desmineralización generalizada de los huesos que los hace muy susceptibles a las fracturas. Cualquier signo de alteración dental es signo de alerta para el diagnóstico precoz de la OI. Si existe alguna sospecha, es mejor hacer un examen radiográfico. En la OI pueden encontrarse también coronas dentarias traslúcidas o con bandas transversales de decoloración, erupción ectópica, impactación de molares

permanentes, agenesias dentarias y anomalías de la oclusión, como mordida abierta anterior o posterior y mordida cruzada (18).

2.4.3 Dentinogénesis imperfecta tipo II

Es característico ver piezas dentales de color azul-marrón, se ven traslúcidos-opalescentes. Además, en las piezas temporales son más afectadas que las permanentes. Presenta dentina blanda, por lo que el esmalte tiende a fracturarse o las coronas se desgastan rápidamente; en la parte radiográfica, raíces cortas y romas, obliteración de la cámara pulpar. Puede presentar infecciones periapicales frecuentemente (18).

2.4.4 Dentinogenesis imperfecta tipo III

Es característico de una población estadounidense. Las piezas dentales son de color ámbar, mucha atrición y exposiciones pulpares. El esmalte se puede observar picoteado e hipocalcificados. Radiográficamente, la dentición temporal presenta cámaras pulpares amplias (18).

2.4.5 Displasia dentinaria tipo I

No se relaciona con el gen DSPP, piezas dentales sin pérdida de esmalte, pero son opalescentes. Afecta ambas denticiones. Presenta pérdida temprana de piezas dentales. Radiográficamente: raíces cortas, cónicas o sin ellas, ápices redondeados, cámaras pulpares y conductos radiculares casi completamente obliterados. Puede presentar infecciones periapicales (18).

2.4.6 Displasia dentinaria tipo II

Es menos frecuente que la dentinogénesis imperfecta. La dentición temporal muestra un aspecto clínicamente que se parece a la dentinogénesis imperfecta y en radiografía se parece a la displasia dentinal tipo I. En los dientes permanentes tienen un color y forma radicular normales. Radiográficamente, se observan cámaras pulpares con una forma de llama, las raíces tienen una forma normal, pero los conductos radiculares se encuentran obliterados. No hay lesiones periapicales (18).

2.5 Dogma central

2.5.1 Estructura del ADN y dogma central

Las instrucciones que determinan todas las características y funciones de un organismo se encuentran en su material genético: el ADN (ácido desoxirribonucleico).

La estructura de doble hélice del ADN, que los investigadores James Watson y Francis Crick propusieron en el año 1953, proporcionó respuestas a múltiples interrogantes existentes sobre la herencia. Predijeron la autorreplicación del material genético y la idea de que la información genética estaba contenida en la secuencia de las bases que conforman el ADN. Más aún, con el correr de los años y de las investigaciones, se determinó que todos los seres vivos, de la misma especie, poseen un ADN similar, formado a partir de las mismas unidades: los nucleótidos. Este código genético mediante el cual se «escriben» las instrucciones celulares es común a todos los organismos. Es decir, que el ADN de un ser humano puede ser «leído» dentro de una bacteria, y una planta puede interpretar la información genética de otra planta diferente. A esta propiedad de la información genética se la conoce como «universalidad del código genético» (20).

El ADN tiene la función de «guardar información»; es decir, contiene las instrucciones que determinan la forma y características de un organismo y sus funciones. Además, a través del ADN se transmiten esas características a los descendientes durante la reproducción tanto sexual como asexual.

Todas las células, procariotas y eucariotas contienen ADN. En las células eucariotas el ADN está contenido dentro del núcleo celular, mientras que en las procariotas, que no tienen un núcleo definido, el material genético está asociado a una serie de proteínas en un complejo conocido como nucleoide en el citoplasma celular.

En las células eucarióticas el ADN está organizado en cromosomas. Los cromosomas son lineales, mientras que en los organismos procariotas, como las bacterias, el genoma es una molécula circular (20-21).

El ADN se compone de dos cadenas, cada una formada por nucleótidos. Cada nucleótido, a su vez, está compuesto por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada.

Las bases nitrogenadas son cuatro: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G); una A siempre se enlaza a una T y una C se enlaza a una G, mediante enlaces de hidrógeno, en la doble cadena.

Se dice que las bases enlazadas son complementarias. El ADN adopta una forma de doble hélice, como una escalera caracol donde los lados son cadenas de azúcares y fosfatos conectadas por «escalones», que son las bases nitrogenadas. La molécula de ADN se asocia a proteínas llamadas histonas y se encuentra muy enrollada y compactada para formar el cromosoma. La doble hélice de ADN con las bases nitrogenadas complementarias que se ubican hacia dentro y establecen uniones no covalentes (o fuerzas de atracción) entre sí mantienen la estructura de la molécula. Las desoxirribosas (azúcares) y los grupos fosfato constituyen las columnas de la molécula.

2.5.2 Dogma central de la biología molecular

Es el proceso esencial del sistema empleado para garantizar la perpetuidad de la información genética de un organismo determinado y el flujo de dicha información desde el ADN hasta la síntesis de proteínas funcionales.

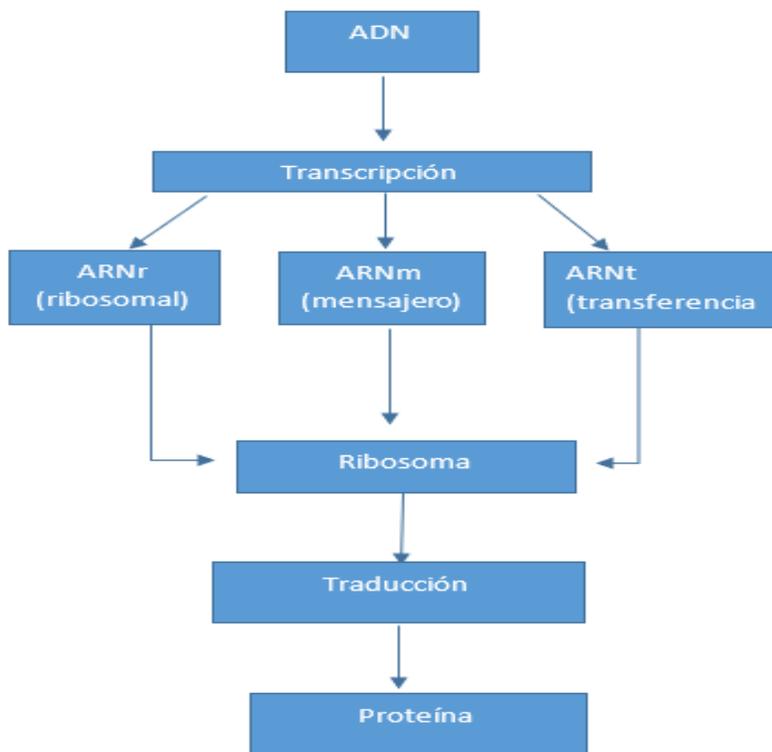


Figura 7. Esquema dogma central de la biología molecular
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Durante la replicación, la molécula de ADN se desenrolla, separando sus cadenas. Cada una de estas servirá como molde para la síntesis de nuevas hebras de ADN. Para esto, la enzima ADN-polimerasa coloca nucleótidos siguiendo la regla de apareamiento A-T y C-G. El proceso de replicación del ADN es semiconservativo, ya que, al finalizar la duplicación, cada nueva molécula de ADN estará conformada por una hebra «vieja» (original) y una nueva (20,21).

La replicación es un mecanismo en el que el ADN logra duplicarse de manera que obtiene una copia idéntica. El ADN se caracteriza por tener una estructura de doble hélice, este proceso se da por medio de:

1. Desenrollamiento y apertura de la doble hélice
2. Síntesis de la hebra complementaria (22-23).

2.5.3 Transcripción

La primera etapa de la expresión genética es la transcripción, la cual ocurre dentro del núcleo de las células eucariotas. La transcripción es el paso más regulado de la expresión genética y consiste en la formación de una molécula de ARN a partir de la información genética contenida en un segmento de ADN. Es decir, da lugar a una copia de ARN con secuencia complementaria y antiparalela, a partir de una secuencia molde en una de las hebras del ADN, mientras que en la replicación se copia el cromosoma entero. La transcripción es más selectiva y específica, pues responde a las necesidades fisiológicas y metabólicas de la célula.

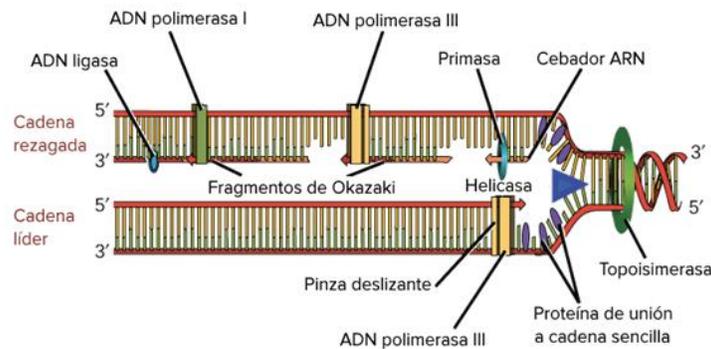


Figura 8. Replicación del ADN

Fuente: Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. & Jackson, R.B. (2011). Origins of replication in *E. coli* and eukaryotes (Orígenes de replicación en *E. coli* y eucariontes). En *Campbell biology* (10° ed., pág. 321). San Francisco, CA: Pearson.

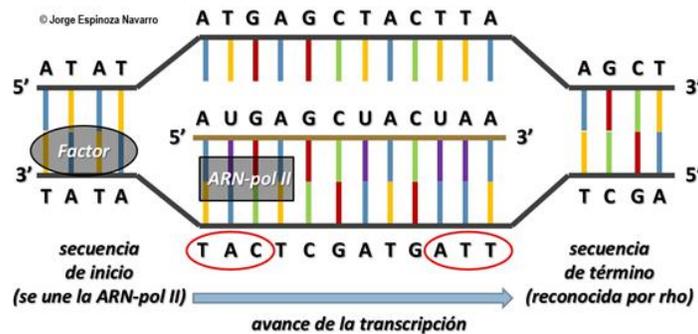


Figura 9. Transcripción del ADN

Fuente: Ramón, O. (2016). *Genética y Reflejos*. Recuperado de <http://geneticaolimpiaramon.blogspot.com/>

2.5.4 Traducción

La siguiente etapa de la expresión genética consiste en la síntesis de proteína propiamente dicha. El ARNm pasa del núcleo al citoplasma, donde el mensaje es traducido por los ribosomas a una proteína.

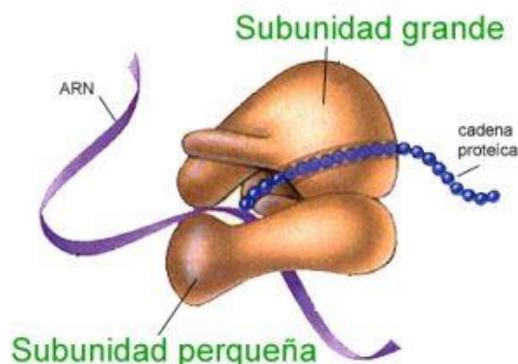


Figura 10. Subunidad pequeña y grande ribosomal

Fuente: Cazaux, S. (2016). *El Dogma Central de la Biología Molecular*. OpenBio UChile. Recuperado de <http://openbio.cl/biologia-sintetica/el-dogma-central-de-la-biologia-molecular/>

Después de un complejo proceso, llamado *splicing* o editaje, el transcrito primario que emerge de la transcripción se modifica para eliminar los intrones, que son fragmentos intercalados en la secuencia de un gen que no acarrean información codificante. Después de eliminarse los intrones, los exones son enlazados entre sí hasta conseguir un ARN mensajero maduro o ARNm. Este entra al ribosoma, que es la maquinaria de síntesis proteica y se encarga de descodificar la secuencia de nucleótidos, con la participación de ARNs de transferencia (ARNt), a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido específico.

Las investigaciones realizadas en células eucariotas han permitido conocer la estructura de sus genes, la cual incluye regiones codificantes denominadas exones y las no codificantes, intrones.

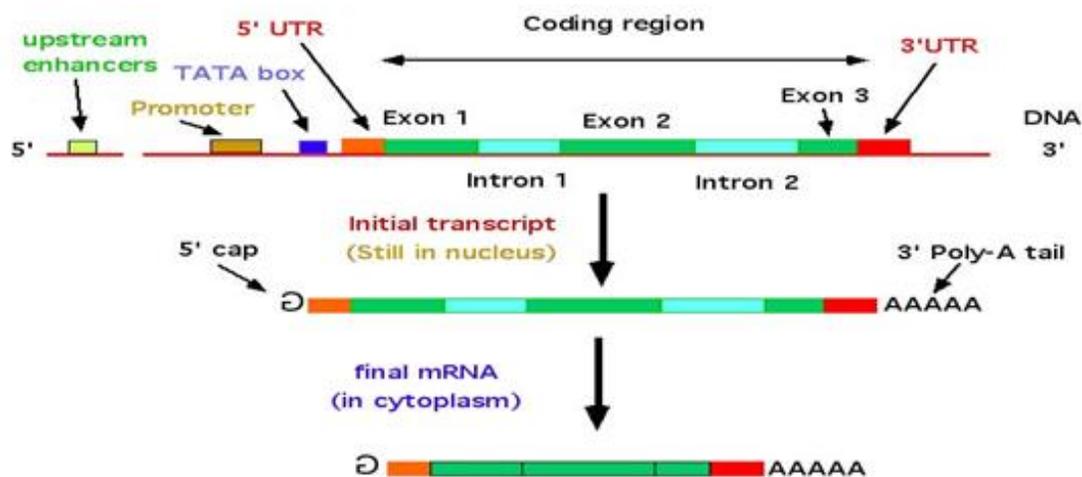


Figura 11. Intrones y exones en la transcripción del ADN
Fuente: Brands. A. (2010).

Desde hace varias décadas se conoce que solo una pequeña fracción del genoma humano está formada por secuencias codificadoras de proteínas y que mucho del ADN no codificador tiene importantes funciones biológicas. Además de codificar los exones, el genoma contiene secuencias que se transcriben en moléculas funcionales de ARN, regiones reguladoras que controlan la expresión génica, orígenes de la replicación y regiones de codones que juegan roles estructurales o de regulación a nivel cromosómico (24).

Con las investigaciones dadas acerca del ADN no codificante, se ha logrado confirmar el conocimiento de la variabilidad en el tamaño del genoma, mecanismo de la duplicación del gen y de mutaciones (24).

Los ARN no codificadores tienen una función principalmente de regulación espacial o temporal y son capaces de interrumpir o eliminar segmentos específicos para evitar una mutación dañina.

Las funciones principales del ADN no codificante son (25):

- Regular la traducción de las isoformas de las proteínas.
- Influir en el comportamiento de los genes por la capacidad de transcripción de distintos tipos de ARN.
- Regular la expresión diferencial de los genes.
- Cumplir con un papel estructural en los cromosomas como los centrómeros o telómeros.
- Crear nuevos genes con nuevas funciones por medio de los pseudogenes.
- Estudiar la filogenia, al proceder de la duplicación de pequeñas regiones del ADN, permiten realizar un rastreo de estas secuencias repetitivas.
- Usar el ADN no codificante por medio de los glóbulos blancos para regular la actividad de un grupo de genes que determinan su forma y función.

2.6 Microbiota oral

Por mucho tiempo y por más de un siglo, varias decenas de especies bacterianas y fúngicas han sido aisladas de la cavidad oral, pero pronto se constató que el número de microorganismos cultivados era muy inferior al observado en el microscopio. Así, gracias a las técnicas moleculares independientes del cultivo como la clonación del gen ribosómico 16S y, seguidamente, con la aparición de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento, se ha podido estimar la diversidad bacteriana total de la cavidad oral, identificando más de 600 especies o filotipos (26).

La cavidad bucal está llena de bacterias. Según Serrano et al., la microbiota oral es uno de los ecosistemas microbianos más antiguos en ser reconocido, y su descripción inicia en 1863 cuando Anton van Leewenhoek observa por primera vez en el microscopio a estos microorganismos (animálculos) en placas dentales. Se menciona que en la microbiota oral existen unos 600 a 700 taxones (27).

La microbiota normal de un individuo se entiende como el conjunto de microorganismos que colonizan permanentemente a la mayoría de los individuos sanos de la población (28). La microbiota o microbioma es el ecosistema de bacterias que habitan tanto por dentro como por fuera del cuerpo. Se encuentran en mucosas y piel, pero la mayor parte de ellas están en el intestino (lo que suele llamarse flora intestinal). El microbioma es tan importante para la salud y evolución que algunos investigadores lo llaman «órgano» y «genoma extendido». A pesar de ser tan pequeños, su población es gigante; por cada célula humana hay 10 microorganismos, y por cada gen humano 100 genes en el microbioma. Esto significa que mientras todos los humanos poseen códigos genéticos muy parecidos, el microbioma de un individuo es completamente diferente al de otro (29).

Tradicionalmente, se considera a las bacterias como fuente de enfermedades, pero en realidad la mayoría son beneficiosas y completamente necesarias para tener un sistema inmune fuerte, hormonas balanceadas, digestión correcta, cerebro y demás órganos en óptimas condiciones (29).

El término microbioma lo acuñó Joshua Lederberg «para significar la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que literalmente comparten nuestro espacio corporal y han sido casi ignorados como determinantes de la salud y la enfermedad» (30).

El equilibrio ecológico en la cavidad oral se mantiene a través de interacciones entre especies interespecíficas y antagonistas. Sin embargo, las perturbaciones que alteran el equilibrio de este ecosistema pueden conducir al crecimiento excesivo de especies con potencial patogénico y, a su vez, al desarrollo de enfermedades orales (31).

Las enfermedades bucodentales surgen como resultado de un cambio en la proporción de ciertas especies con mayor potencial patogénico dentro de la flora autóctona. Este cambio en la microbiota «comensal» se acompaña de la interrupción de la homeostasis inmune del huésped y el desarrollo de una respuesta inflamatoria. Por lo

tanto, es la prevalencia de una cierta combinación de especies microbianas junto con la incapacidad del huésped para contener su proliferación, lo que indica el riesgo de desarrollar una enfermedad. En consecuencia, el estudio de la patogénesis microbiana en la enfermedad oral ha cambiado el enfoque de una sola especie bacteriana al de la ecología y la virulencia de las comunidades polimicrobianas (31).

Del 40 % de las especies bacterianas que se han cultivado, se ha reconocido que aproximadamente 10 tienen potencial patogénico, la mayoría de las cuales son bacterias anaerobias gramnegativas que florecen en bolsas subgingivales como *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, y *Prevotella* sp (31).

La evidencia reciente ha indicado vínculos fisiopatológicos asociativos entre las enfermedades inflamatorias orales y las sistémicas como la diabetes, las cardiovasculares y la artritis reumatoide. Sin embargo, establecer un verdadero vínculo causal entre las enfermedades inflamatorias orales y las sistémicas es una tarea costosa, obstaculizada por factores de riesgo compartidos. Lo que ahora está muy claro es que los trillones de bacterias que constituyen el microbioma no son espectadores pasivos y pueden jugar un papel crítico en la enfermedad sistémica. No obstante, se necesita más investigación para desarrollar estrategias para atacar los mecanismos disbióticos y mejorar la salud oral (31).

La microbiota oral es compleja (28):

- Cocos Gram positivos: *Streptococcus viridans*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. oralis* y *S. mitis*. En menor medida: *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y los anaerobios *Peptostreptococcus* y *Peptococcus*.
- Cocos Gram negativos: especies del género *Neisseria* y *Veillonella* tanto aerobios como anaerobios.
- Bacilos Gram positivos: *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *C. matruchotii*, *Rothia dentocariosa* y otros llamados difteroides o difteromorfos.

- Bacilos Gram negativos: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Campylobacter* y *Haemophilus*.
- Otros: *Espiroquetas* comensales, hongos como *Cándida*, *Mycoplasma* y escasos protozoos como *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis*.

Con el paso del tiempo se ha encontrado un cambio en la microbiota oral, Tabla 2 según Jenkinson (32):

Tabla 2.
Microbiota oral en diferentes enfermedades

Enfermedad	Etiología del patógeno microbiano tradicional	Nuevo concepto de comunidades patógenas
Caries dental	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. downei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i> , <i>S. mutans</i> , <i>Scardovia wiggsiae</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>Prevotella</i> spp, <i>Selenomonas</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp
Caries radicular	<i>Actinomyces gerencseriae</i> , <i>A. israelii</i> , <i>Streptococcus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp, <i>A. naeslundii</i>	<i>Actinomyces</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Prevotella denticola</i> , <i>Pseudoramibacter</i> spp, <i>Enterococcus faecalis</i>
Pulpitis	<i>E. faecalis</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>Parvimonas micra</i> (<i>Peptostreptococcus micros</i>), <i>Prevotella intermedia</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp, <i>S. intermedius</i> , <i>Lactobacillus</i> spp, <i>A. israelii</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>P. micra</i> , <i>Prevotella baroniae</i> , <i>Dialister invisus</i> , <i>Olsenella uli</i> , <i>Prevotella</i> spp
Gingivitis	<i>Fusobacterium</i> spp, <i>Actinomyces</i> spp, <i>P. micra</i> , <i>P. gingivalis</i>	<i>Eubacterium nodatum</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>P. micra</i>
Periodontitis agresiva	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp	<i>Selenomonas</i> spp, <i>Prevotella</i> spp, <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>P. gingivalis</i>
Periodontitis crónica	<i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>Fusobacterium</i> spp	<i>P. micra</i> , <i>Campylobacter gracilis</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>Eubacterium saphenum</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Prevotella</i> spp, <i>Treponema</i> spp, <i>Selenomonas noxia</i> , <i>E. corrodens</i>
Halitosis (mal olor oral)	<i>Prevotella</i> spp, <i>P. gingivalis</i> , <i>Actinomyces</i> spp	<i>Atopobium parvulum</i> , <i>Dialister phylotype</i> , <i>Eubacterium sulci</i> , <i>TM7 phylum</i> , <i>Solobacterium moorei</i> , <i>Prevotella</i> spp

Fuente: Jenkinson, H. (2011).

La microbiota oral es cambiante en un mismo ecosistema oral, este proceso se conoce como sucesión microbiana, que es la sustitución de unos organismos por otros y existen dos tipos: alogénica y autogénica (28):

- La alogénica, se produce por cambios en el hábitat de tipo no microbiano como el nacimiento, la erupción de los primeros dientes, la vida adulta, la caída de los dientes, el uso de prótesis dentales.
- La autogénica, consiste en la sustitución de unos microorganismos por otros más adaptados al ambiente cambiado por los primeros colonizadores debido al consumo de nutrientes, acumulación de productos de desecho excretados, cambios de pH, etc., que propician la colonización por nuevas especies más adaptadas a las nuevas condiciones ambientales del ecosistema microbiano.

Los microorganismos colonizan las superficies orales humanas en cuestión de horas después del parto. Durante el crecimiento posnatal, los cambios fisiológicos como la erupción de los dientes primarios y la sustitución de la dentición primaria por la permanente alteran en gran medida los hábitats microbianos, los cuales, a su vez, pueden dar lugar a cambios de constitución de la población microbiana en las diferentes fases de la vida de las personas. La estructura filogenética microbiana varía con el envejecimiento, por lo que la microbiota oral se debe definir con base en la edad y nichos orales (33).

Las especies del género *Streptococcus* se encuentran en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua. Las especies del género *Actinomyces* se encuentran a nivel supragingival e infragingival y en fisuras de la lengua. Otras bacterias como *Veillonella parvula* y *Neisseria* pueden ser aisladas en todos los hábitats orales. También puede existir colonización intracelular en células epiteliales de la cavidad bucal por complejos bacterianos constituidos por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (33).

Estudios poblacionales han utilizado técnicas genómicas del gen 16S rRNA y han confirmado que los principales *phylum* aislados en la cavidad oral son *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteriodes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. También se ha determinado que los géneros bacterianos presentes en ella son *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacterias*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*, siendo los más frecuentes *Prevotella*, *Selenomonas* y *Streptococcus*. Este último se ha reportado como el preponderante a nivel de esta cavidad y se han diferenciado más de 16 especies de esta bacteria, las más frecuentes *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis* (34).

Mientras que el bacterioma oral está cada vez mejor caracterizado, el microbioma o microbioma fúngico es un bioma nuevo y poco reconocido. Sin embargo, estudios recientes basados en el ADN del microbioma oral, han revelado una gran cantidad de especies fúngicas como potenciales residentes orales. Considerando un enfoque de pirosecuenciación, estudio histórico que perfila el microbioma oral sano «basal» se identificaron 85 géneros y más de 100 especies de hongos comensales diferentes (31).

2.6.1 Mucosa bucal

La microbiota de la mucosa bucal está constituida, salvo en las encías y los labios, casi exclusivamente por cocos grampositivos anaerobios facultativos y, en especial, por *Streptococcus viridans*. Los labios, al representar una zona de transición de piel a mucosas, estarán colonizados por una microbiota cutánea como *Staphylococcus epidermidis* y por especies de los géneros *Kocuria* y *Micrococcus*; además, se detectan también abundantes *Streptococcus viridans* procedentes de la saliva y el dorso de la lengua debido la acción del humedecimiento labial (33).

En la mucosa yugal predominan también los *Streptococcus viridans*, destacando *Streptococcus mitis*; le siguen en frecuencia *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius*; también se aislarán otros microorganismos presentes en la saliva. En el paladar duro existe una microbiota estreptocócica similar a la de la mucosa yugal. En el paladar blando aparecen bacterias propias de las vías respiratorias altas como especies de *Haemophilus*, *Corynebacterium* y *Neisseria*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus viridans*. La microbiota de la encía está íntimamente relacionada con la de la placa coronal lisa en la unión dentogingival y con la de localización subgingival (33).

2.6.2 Superficies dentarias

Géneros como *Campylobacter*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Leptotrichia* y *Streptococcus* (especialmente *Streptococcus sanguinis*) se han asociado con dientes libres de caries en preescolares y escolares. También se detectó alta frecuencia de *Haemophilus parainfluenza*, *Gemella haemolysans*, *Slackia exigua*, y las especies *Rothia* (33).

La composición de la microbiota del diente está influenciada no solo por la ubicación del diente dentro de la boca y la proximidad al flujo salival de conductos cercanos, sino también por la anatomía y la fisiología de la superficie del diente y la encía circundante (33).

2.6.3 Surco gingival

Los anaerobios obligatorios como la *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Treponema* residen principalmente en grietas gingivales o bolsas periodontales donde el ambiente es anaeróbico.

En los surcos gingivales sanos (menos de 4 mm de profundidad), predominan Proteobacterias, en particular el gammaproteobacteriae de género *Acinetobacter*, *Haemophilus* y *Moraxella*. Dentro del filo *Firmicutes*, la clase bacilos que comprende género *Streptococcus*, *Granulicatella* y *Gemella* se asocian a estados de salud. Estos géneros se pueden considerar simbioses, que también regresan a las bolsas periodontales en alta proporción después de los tratamientos periodontales en alta proporción después de los tratamiento de periodoncia. Se ha demostrado en diversos estudios la gran abundancia de *Treponema denticola* junto con *Porphyromona gingivalis* y *Tannerella forsythia* en la capa superior del biofilm. Fue sorprendente encontrar *Treponema denticola* y *Porphyromona gingivalis* colonizando en estrecha proximidad, lo que indica algún tipo de dependencia metabólica (33).

Las incidencias de *Actinobacillus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter* en surco gingival durante el embarazo son significativamente mayores que en las mujeres no embarazadas, mientras que *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* no cambian. Las especies de *Cándida* se detectan con mayor frecuencia durante el embarazo (33).

2.6.4 Lengua

El biofilm que se forma en la superficie de la lengua, aproximadamente el 45 %, son cocos grampositivos anaerobios facultativos, destacando sobre los demás *Streptococcus salivarius*, seguido de *Streptococcus mitis*, *Streptococos* del grupo *milleri* y es frecuente la detección de *Streptococcus mucilaginosus*; le siguen en proporción los cocos gramnegativos anaerobios estrictos (aproximadamente el 16 % de diversas especies de *Veillonella*) y bacilos grampositivos anaerobios facultativos (en torno al 12 %, fundamentalmente *Actinomyces* spp), en menor proporción pueden detectarse diversas especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* y *Haemophilus* (33).

- En el dorso de la lengua se presentan varias especies de *Streptococcus*, como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus* sp clon FP015, y *Streptococcus* sp clon FN051, *Granulicatella adiacens* y *Veillonellas* spp.
- En la superficie lateral de la lengua predominan *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mitis* bv, *Streptococcus* sp clon DP009, *Streptococcus* sp clon FN051, *Streptococcus australis*, *Granulicatella adiacens*, *Gemella hemolysans* y *Veillonellas* spp.

2.6.5 Materiales artificiales

La composición de bacterias en componentes protésicos no es la misma que en las piezas naturales de cada persona, es variable. Las bacterias que más se encuentran en la cavidad bucal de personas con prótesis es *Prevotella* y *Veionella*, especies que se encuentran en los pacientes con estomatitis protésica (35).

Kumar y otros (36) demuestran que los microorganismos presentes en la placa subgingival de pacientes con periodontitis también pueden sobrevivir en la zona de implantes, prevaleciendo los *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis*. Cuando sucede una periimplantitis, en estos casos la dominan diversas bacterias anaerobias gramnegativas como *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus* sp, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Helicobacter pylori* y *Tannerella forsythia* (35).

2.7 Microbioma 16 S

Para poder comprender el microbioma 16S, es importante comenzar con la idea de que el ribosoma es una organela celular compleja. Está compuesta por dos subunidades: una pequeña y otra grande.

El ribosoma procariótico está compuesto por dos subunidades, la menor se denomina 30S y la mayor 50S. La subunidad 30S contiene una molécula única de ARNr, denominada ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de *small*) [37], mientras que la subunidad 50S contiene una molécula de ARNr 23S y 34 proteínas (L1-L34; L, *large*) (37), y otra 5S ARNr (38).

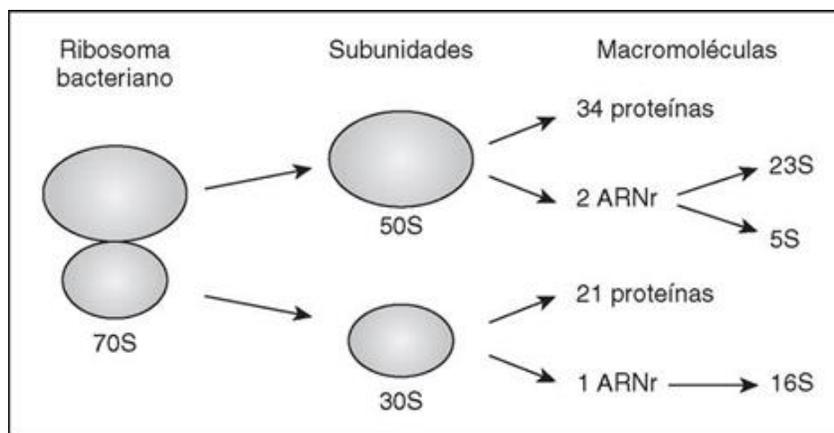


Figura 12. Ribosoma bacteriano
Fuente: Rodicio, MR., Mendoza, MC. (2004).

2.7.1 ARNr 16S

El ARN ribosomal (ARNr) el 16S actualmente se utiliza para obtener información correspondiente a la taxonomía y filogenia de las especies bacterianas (37). Hoy en día se dice que se han encontrado más de 700 biotipos de comunidades bacterianas orales.

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1 500 nt, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Está compuesto por regiones conservadas y variables, las últimas, denominadas de V1-V9, constituyen la base para la clasificación taxonómica. En este proyecto se estudió la región V3-V4.

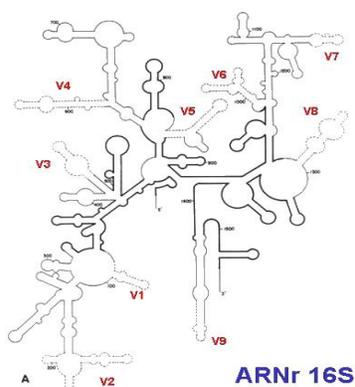


Figura 13. Estructura ARNr 16S

Fuente: Arena, M., Chiappa, F. (2017).

El análisis de la secuencia de ARNr 16S de diferentes grupos filogenéticos permite que se conozca la secuencia de las regiones variables propias de bacterias específicas que se conocen como secuencias firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos, o en la mayor parte, los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca, o raramente, están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, las secuencias firmas pueden utilizarse para identificar a cada bacteria dentro de su propio grupo (37).

El resultado de la secuenciación del ARNr 16S, se debe comparar con las secuencias de referencia para observar si presentan alguna relación con el genoma en estudio (37). Los datos de este se analizaron frente a la base de datos Greengenes, disponible en la nube para los usuarios de Illumina. Esta base de datos se encarga de una alineación de secuencia múltiple que contiene genes de ARNr del microbioma 16S tanto arquea como bacterianos, esto facilita la colocación taxonómica (39). Todo este proceso ayuda a construir relaciones filogenéticas e identificación bacteriana.

Anteriormente, la secuenciación del ARNr 16S se hacía mediante Sanger, en la actualidad se hace mediante la NGS: *Next Generation Sequencing*, por medio de la cual se obtienen secuencias más largas y confiables que han ayudado al avance de la metagenómica (40).

Actualmente, las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han impulsado rápidamente el campo de la genómica, haciendo que la identificación de un gran número de genomas sea en corto tiempo. La ventaja de las NGS es que puede realizar millones o billones de lecturas durante el proceso y tienden a ser secuencias de longitud más corta. Este tipo de secuenciación también se puede utilizar para el estudio de microorganismos patógenos, mecanismos de resistencia a antibióticos (41).

La secuenciación de novo es cuando no se presenta un genoma de referencia. Se utiliza solo la información obtenida de la secuenciación para reconstruir el genoma, sin conocimiento previo de su organización (41).

2.8. Daño Molecular: Familias afectadas del presente estudio

2.8.1 Genograma I: Familia 001

Fenotipo: Hipoplásico

Mutación genética: FAM20A es un miembro de la familia de tres proteínas homólogas: A, B y C. Es una serin quinasa secretora atípica, relacionadas con la biomineralización (17)

Se da una sustitución de una timina por una citosina de la posición 988 en el exón 7 y duplicación del exón del 1 al 4 de la FAM20A.

Patrón de herencia: Autosómico recesivo

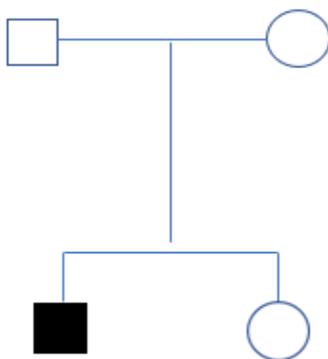


Figura 14. Genograma Familia 001
Fuente: Elaboración propia, 2018

En la familia número 001 se identificó una mutación en la proteína FAM20A con un fenotipo hipoplásico. Con un patrón de herencia autosómico recesivo, la familia está constituida de padre y madre cuyo fenotipo no se encuentra afectado; además, por dos hijos, una mujer no afectada y un hombre afectado de amelogénesis imperfecta producto de la mutación en la FAM20A.



Figura 15. Fotos intraorales sujeto 01
Fuente: Elaboración propia, 2018

Las mutaciones bialélicas de la FAM20A causan dos afecciones dentro de las cuales una de ellas es la amelogénesis imperfecta y el síndrome de fibromatosis gingival, ambos desórdenes implican amelogénesis imperfecta tanto en la dentición primaria como en la secundaria, también se presentan con diferentes grados de hiperplasia gingival, retraso en la erupción dental y calcificación pulpar.

Un fenotipo oral distintivo se comparte en ambas condiciones (17), para poder identificarlo se realiza la secuenciación de Sanger de FAM20A en casos con ese fenotipo y se identifica dos probandos con mutaciones heterocigóticas individuales, que son patógenas.

2.8.2 Genograma II: Familia 002

Fenotipo: Hipoplásico

Mutación genética: Amelotina (AMTN), delección completa de exones 3, 4, 5 y 6 de la AMTN

Patrón de herencia: Homocigota dominante

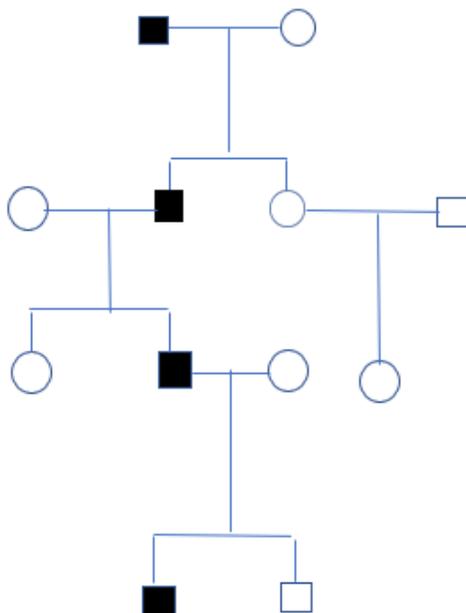


Figura 16. Genograma Familia 002
Fuente: Elaboración propia, 2018.

En el genograma aparecen sombreados los miembros de la familia afectados.

La familia se caracterizó por una AI hipomineralizada generalizada con alguna hipoplasia que afectaba a todos las piezas dentales. Las cualidades de AI en este grupo constan de tener una pérdida de esmalte poseruptiva con retención de una delgada banda de esmalte en el margen cervical. En el examen clínico de los dientes, los tres miembros de la familia heterocigotos para la mutación mostraron una IA hipomineralizada.



Figura 17. Fotos Intraorales
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Se ha demostrado que la amelotina (AMTN) está restringida a la lámina basal de los ameloblastos en etapa de maduración, la estructura que une los ameloblastos con el esmalte en desarrollo. Los estudios constatan que la AMTN promueve la precipitación de cristales de hidroxapatita (HA), la cual desempeña un papel fundamental en la compactación final de la capa de superficie de esmalte aprismática durante la etapa de maduración de la amelogénesis (16).

La amelotina se encuentra predominantemente en el esmalte dental durante la etapa de maduración de la amelogénesis y en niveles relativamente bajos en el epitelio de la unión gingival después de la erupción dental. Esta proteína secretada se localiza en la interfaz entre la superficie del esmalte y los ameloblastos, las células formadoras de esmalte, en la etapa de maduración y es una proteína de matriz de esmalte única con una capacidad notable para promover la mineralización de fosfato de calcio (42).

Algunos estudios indican que la proteína de esmalte AMTN es un potente promotor de la mineralización de fosfato de calcio, por lo cual es de importancia en el establecimiento de la capa de esmalte superficial aprismática y compacta porque su expresión coincide con su formación. Debido a que la capa más superficial de esmalte es la interfaz directa con la cavidad oral, el esmalte de superficie está colonizado por biopelículas microbianas y es el sitio inicial para la formación de placa dental, caries y erosión altamente prevalentes. Este hallazgo puede tener implicaciones directas para el desarrollo de estrategias preventivas o restaurativas para el esmalte dental (42).

2.8.3 Genograma III: Familia 003

Fenotipo: Hipomineralizado

Mutación: No se conoce

Patrón herencia: Autosómico recesivo

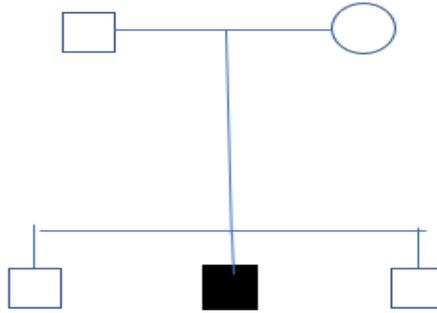


Figura 18. Genograma Familia 003
Fuente: Elaboración propia, 2018.



Figura 19. Fotos intraorales
Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la familia número 003 no se ha identificado la mutación de la proteína afectada, la cual presenta un fenotipo hipomineralizado con un patrón de herencia autosómico recesivo. La familia consta de padre (fallecido) y madre cuyo fenotipo no se encuentra afectado, además está compuesta por tres hijos varones, de los cuales solo uno es el miembro portador de amelogenésis imperfecta (Figura 18).

2.8.4 Genograma IV: Familia 004

Familia 004

Fenotipo: Hipoplásico

Mutación Genética: Ameloblastina (AMBM)

Patrón de herencia: Autosómico recesivo

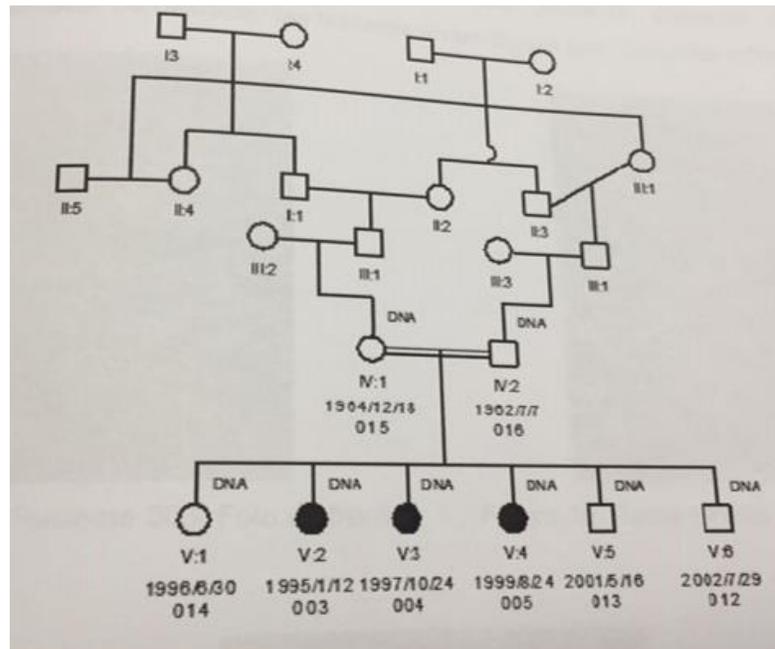


Figura 20. Genograma Familia 004

Fuente: Archivos Proyecto N.º 440-B2-334 AI. Identificación de familias costarricenses y posibles determinantes genéticos. Dra. Gina Murilo Knudsen, 201-2016.

En la familia número 004 se identificó una mutación en la proteína ameloblastina, con un fenotipo hipoplásico y un patrón de herencia autosómico recesivo. La familia consta de padre y madre cuyo fenotipo no se encuentra afectado; además, este grupo posee una doble consanguineidad de primos segundos, esto está representado en el genograma mediante la doble línea en los pacientes N1 y N2. Está compuesta por seis hijos, cuatro mujeres y dos hombres, de los cuales tres mujeres están afectadas por amelogénesis imperfecta producto de la mutación en la ameloblastina (AMBM).



Figura 21. Fotos intraorales
Fuente: Elaboración propia, 2018.

A la ameloblastina se le conoce también con el nombre de amelina y es una proteína esencial en la formación del esmalte dental. Ha sido identificada y aislada del cromosoma 4q21 entre los marcadores D4S409 Y D4S400. Su mutación ha sido identificada en la expresión de la amelogénesis imperfecta de tipo hipoplásico.

Existen estudios de hibridación en los cuales se ha demostrado que la ameloblastina se expresa en niveles altos por los ameloblastos, las células encargadas de producir esmalte y una moderada expresión en la vaina epitelial de Hertwig y una presencia transitoria en los preodontoblastos. Asimismo, otros estudios sobre inmunohistoquímica han demostrado que en el ameloblasto hay una intensa concentración de amelina en el citoplasma y en el proceso de Tomes de los ameloblastos secretores (42).

Aunque no está completamente entendida la función de las ameloblastinas, numerosos estudios han mostrado que la ameloblastina regula la diferenciación ameloblástica y se cree que controla y promueve la mineralización y elongación de los cristales de hidroxapatita en el esmalte durante el desarrollo dental (39).

La AMBN es la segunda proteína más abundante en la matriz del esmalte, después de la amelogenina. Se han efectuado estudios en ratones en los que se ha visto que presentan una pobre calidad de esmalte dental, esto se debe principalmente a una delección de los exones 5 y 6 AMBN y una sobreexpresión de la AMBN. Sin embargo, a diferencia del AMELX, no se ha reportado una enfermedad que cause variantes en la AMBN (35).

2.8.5 Genograma V: Familia 005

Familia 005

Fenotipo: Hipoplásico

Mutación Genética: LAMB3

Patrón de herencia: Autosómico recesivo

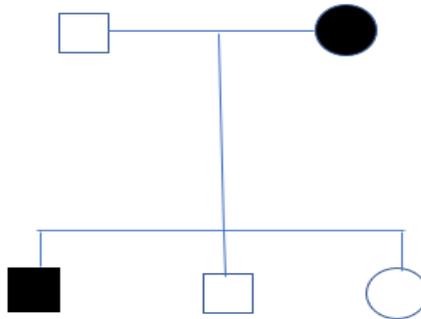


Figura 22. Genograma Familia 005
Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la familia número 005 se identificó una mutación en la proteína LAMB3, con un fenotipo hipoplásico. Con un patrón de herencia autosómico recesivo. La familia consta de padre y la madre afectada; se compone, además, de tres hijos, dos varones y una mujer en donde solo un varón mayor en edad se encuentra afectado.



Figura 23. Fotos intraorales
Fuente: Elaboración propia, 2018.

El gen LAMB3 es una subunidad de una proteína llamada laminina 332. La laminina 332 se compone de tres subunidades: alfa, beta y gamma. El gen LAMB3 contiene la subunidad beta (43).

La proteína laminina 332 es una de las encargadas del desarrollo dental, es por eso que se encuentra como una mutación en la amelogénesis imperfecta y también en casos de epidermólisis bullosa de la unión (43).

CAPÍTULO III
MARCO METODOLÓGICO

3. Metodología

El presente es un estudio de casos en el cual se utilizó un estudio metagenómico de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés). Este se realiza, comúnmente, mediante el análisis del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña 30S del ribosoma bacteriano, denominado 16S procariótico. El protocolo describe el método para preparar las muestras y secuenciar las regiones variables V3 y V4 del gen 16S del ARNr. El sistema es capaz de secuenciar 96 librerías (comunidades bacterianas completas de 96 muestras diferentes). Los criterios de inclusión fueron familias costarricenses afectadas por amelogenesis imperfecta, por lo tanto, con un solo miembro de la familia afectado, ya forman parte del estudio. No se contaron con criterios de exclusión.

3.1 Recolección de las muestras

Se utilizaron 16 sujetos de investigación pertenecientes a cinco familias costarricenses afectadas de amelogenesis imperfecta. Entre las familias seleccionadas siete pacientes fueron diagnosticados con la condición, los nueve restantes se encontraron sanos. A los 16 sujetos se les entregó un tubo cónico de polipropileno (plástico no tóxico de alta resistencia) con 20 ml de Listerine® (enjuague bucal) diluido con 1:2 de agua desionizada, estéril y se les solicitó realizar un único enjuague fuerte, movilizándolo fuertemente el líquido por toda la boca y entre los dientes. Se pretendía obtener una muestra fiel del contenido bacteriológico, por lo que no se le pidió que se cepillara o enjuagara los dientes antes, pues modificaba la muestra.

Después de 30 segundos de enjuague, se les solicitó depositar el enjuague nuevamente en el tubo, verificando que este estuviera correctamente rotulado.

Los enjuagues se guardaron en refrigeración hasta su procesamiento.

3.2 Extracción del ADN a partir del enjuague bucal

Cada muestra de enjuague se centrifugó a 1 800 g por 30 minutos, a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el botón que contiene células epiteliales y microorganismos orales, se lavó dos veces con 25 ml de solución salina fosfatada (PBS). Después de los dos lavados, se resuspendió el botón en 1 ml de búfer de lisis, al que se le agregó 25 ul de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó toda la noche en baño de agua a 56 °C.

Al día siguiente, se agregó a cada tubo 1 ml de NaCl 3M e inmediatamente después 2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). Los tubos se agitaron en vortex, por al menos 3 minutos. Se volvieron a centrifugar a 1 800g a 4 °C por 15 minutos.

Después de la centrifugación, se forman dos fases: una acuosa en la parte superior y otra orgánica en la inferior que contiene el cloroformo-alcohol isoamílico. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 50 ml, se aseguró no arrastrar la interfase blanca, pues contiene todos los detritos celulares y restos de proteínas digeridas por la proteinasa K. A este nuevo tubo se le agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

El tubo se invirtió varias veces de forma suave hasta obtener el precipitado de ADN. Este se removió del tubo usando una punta de pipeta de boca ancha y se colocó en un microtubo que contenía 1 ml de etanol 70° y se incubó toda la noche a temperatura ambiente, con el fin de permitir la disolución de la sal usada para la precipitación del ADN.

Al siguiente día, se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga durante 10 minutos a 10 000 g. Se decantó el etanol y los botones de ADN se dejaron secar con la tapa abierta en incubadora a 37 °C para eliminar el alcohol. El ADN total se resuspendió en 200 ul de tampón TE pH 7.4 y se volvió a incubar toda la noche a 37 °C. Por último, se agitó en vortex, se cuantificó por espectrometría en un NanoDrop 2000 y se almacenó en el refrigerador a 4 °C hasta su uso.

Posterior a la extracción del ADN del enjuague bucal de las bacterias y células epiteliales, se procedió a realizar la amplificación de cada muestra de las familias de acuerdo con el siguiente protocolo:

- *Primera amplificación:* Primero se agregan los primers V3 y V4 al ADN, para realizar el primer PCR en cada muestra. Además, se coloca la mezcla maestra de la enzima Platinum SuperFi (ADN Polimerasa), Invitrogen, (enzima de alta procesividad que genera una copia del ADN 100 veces más fiel que una polimerasa regular y posee capacidad de corrección, es decir, actividad exonucleasa 3' a 5'. Adicionalmente, incluye un reactivo potenciador, para mejorar la amplificación de regiones de difícil desnaturalización (G-C ricas) y agua en los tubos de PCR. Este proceso tarda alrededor de una hora, dependiendo del termociclador que se use.

Las secuencias específicas del gen utilizadas en este protocolo apuntan a las regiones 16S V3 y V4.

Las secuencias de nucleótidos sobresalientes se agregan a las específicas del gen, la longitud completa; secuencias de cebadores, utilizando la nomenclatura de nucleótidos IUPAC estándar, para seguir el protocolo.

Los objetivos de esta región son:

- 16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGG**N**GGC**W**GCAG

- 16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTAC**HV**GGGTATCTAA
TCC

En la Tabla 3 se ejemplifican las letras que no corresponden a los nucleótidos usuales. Este tipo de primers se conocen como «primers degenerados» y se usan así con el fin de que puedan reconocer todas las variantes del 16S que puedan presentar las diferentes bacterias.

Tabla 3.

Tabla IUPAC de código nucleótidos

IUPAC nucleotide code	Base
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (or U)	Timina (o Uracilo)
W	A or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	Cualquier base
. or -	gap

Fuente: Elaboración propia, 2018.

- *Reacción de amplificación:*

Tabla 4.*Volúmenes para la reacción de amplificación*

	Volumen
ADN microbiano (5 ng/μl)	2.5 μl
Amplicon PCR Forward Primer 1 μM	5 μl
Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM	5 μl
2x Platino SuperFi Máster Mix	12.5 μl
Total	25 μl

Fuente: Elaboración propia, 2018.

- *Programa de amplificación*

95 °C por 3 minutos

25 ciclos de:

95 °C por 30 segundos

55 °C por 30 segundos

72 °C por 30 segundos

72 °C por 5 minutos

Infinito a 4 °C

- *Análisis de los fragmentos 16 S amplificados:* Mediante un *QIAxcel Advanced Instrument* se analizó 1 ul del producto, con el fin de verificar el tamaño del amplicón. Usando los primers para amplificar los fragmentos V3 y V4, el tamaño del producto del PCR debe ser de ~550 bp.

- *Limpieza de los productos de la primera PCR:* Este paso consiste en quitar todos los reactivos no consumidos, primers y dímeros de primers, dejando únicamente el ADN que ha sido amplificado. En este proceso se usan unas partículas magnéticas muy pequeñas conocidas como *AMPure XP beads* que funcionan adhiriendo el ADN que las está cargado negativamente.

Se mezclan en vortex 30 segundos para que queden uniformemente dispersas. Se agregan 20 uL de perlas a cada tubo y se agitan a 1.800 rpm por 2 minutos, en un agitador Eppendorf™ MixMate™.

- Se incuban a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Luego, los tubos se colocan en un magneto y las perlas cargadas con el ADN se adhieren a la parte lateral y al fondo del tubo, lo que permite remover todos los reactivos empleando una pipeta multicanal.
- Posteriormente, las perlas se lavan con 200 uL de etanol al 80 %, recién preparado.
- Se incuban en el magneto por 30 minutos a temperatura ambiente.
- El lavado con etanol al 80 % se repite otra vez, asegurándose de remover todo el alcohol.

- Se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos en el magneto.
- Se remueve la placa del magneto y agrega 52,5 uL de búfer de elución, para separar el ADN de las perlas, agitar a 1 800 rpm por 2 minutos en el Eppendorf™ MixMate™, se incuba a temperatura ambiente por 2 minutos. Se coloca de nuevo en el magneto por 2 minutos.
- Usando una pipeta multicanal, se retira cuidadosamente 50 uL de la elución y se coloca en una placa nueva de 96 pozos. Se cambió las puntas de la pipeta, para evitar contaminación de las muestras.

→ En este punto, se puede parar el proceso.

- *Colocación de índices:* Se agrega 5 uL del ADN, eluído en el paso anterior, en tubos nuevos o en una placa nueva de 96 pozos. Los 45 uL restantes se pueden guardar para otros usos. Los índices son dos secuencias cortas de oligonucleótidos diferentes para identificar cada muestra. Uno de los dos índices se puede repetir, pero el otro no (Tabla 5).

Con esto se puede conocer individualmente todas las bacterias contenidas en una muestra. Los tubos blancos son ocho y se colocan verticalmente alineados en filas de la A a la H, y los anaranjados son 12 colocados horizontalmente y alineados en columnas de la 1 a la 12 (Figura 24).

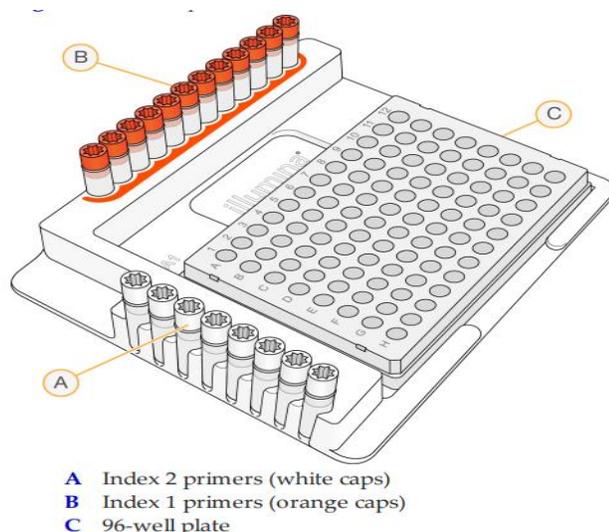


Figura 24. Biblioteca de Secuencias Metagenómicas 16S
Fuente: Guía de preparación para secuencias metagenómicas 16S. (2018).

Tabla 5.*Set de índices*

Índex 1 (i7)	Secuencia	Índex 2 (i5)	Secuencia
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

Fuente: Elaboración propia, 2018.

- *Sistema dual de índices*: Los índices se agregan mediante otra reacción de PCR, siguiendo las indicaciones que se explican a continuación:

Tabla 6.

Volúmenes para reacción de PCR

	Volumen
ADN	5 µl
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 µl
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 µl
2x Platino SuperFi Master Mix	25 µl
Agua grado PCR	10 µl
Total	50 µl

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El PCR se realiza mediante el siguiente programa de amplificación:

95 °C por 3 minutos

8 ciclos de:

95 °C por 30 segundos

55 °C por 30 segundos

72 °C por 30 segundos

72 °C por 5 minutos

Infinito a 4 °C

- *Limpieza de los productos de la segunda PCR:* Se realizó de la misma manera que el primer lavado, usando el volumen total de la reacción, es decir 50 uL y se agregaron 40 uL de perlas AMPure. El resto del proceso es igual al anterior.

Después de remover la placa del magneto y agregar 27,5 uL de búfer de elución (27.5 µl of 10 mM Tris pH 8.5) a cada pozo, para separar el ADN de las perlas. Se agitó a 1 800 rpm por 2 minutos en el Eppendorf™ MixMate™, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Se colocó nuevamente la placa en el magneto y usando una pipeta multicanal se retiró cuidadosamente, 25 uL de la elución y se colocó en una placa nueva de 96 pozos. Se cambió las puntas de la pipeta, para evitar contaminación de las muestras.

→ En este punto, se puede parar el proceso.

- *Validación de la librería:* Correr 2 µl de una dilución 1:5 de la librería final en el QIAxcel para verificar el tamaño de los productos de la PCR con los índices. Usando *primers* V3 y V4, el tamaño esperado es ~630 bp.

- *Fase Final: Cuantificación, normalización y mezcla de todas las muestras:* Illumina recomienda cuantificar las librerías mediante métodos fluorométricos que usan agentes intercalantes en la doble hebra del ADN amplificado.

La concentración del ADN se calcula en nanomolar (nM) con base en el tamaño de los amplicones, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{concentración en } \frac{ng}{\mu})}{660 \frac{g}{mol} \times \text{promedio del tamaño de la librería}} \times 10^6 = \text{concentración en nM}$$

Por ejemplo:

$$\frac{15 \frac{ng}{\mu l}}{660 \frac{g}{mol} \times 500} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

Cada muestra se debe ajustar a una concentración de 10 nM. Todas las muestras se mezclan usando 5 uL de cada una.

- Se procedió a realizar una dilución 1:2 de la mezcla total: 10 uL de la mezcla + 10 uL de NaOH, 0.2 N. Esto implica que la mezcla queda ahora a 5 nM.
- Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la desnaturalización del ADN.
- Se agregaron 20 uL de búfer EB (10 mM Tris pH 8.5), dejando la solución a 2,5 nM.
- En un tubo que contiene 997,6 uL de HT1 (*Hybridization Buffer*) se agregó 2,4 uL de la mezcla de muestras, lo que deja la concentración a 6 pM.
- Se retiró 250 uL a esta preparación y se agregó 250 uL del PhiX (control interno para mitigar los cambios en las bibliotecas desbalanceadas y poco diversas) diluido a 6 pM.
- De la muestra final se cargó 600 ul en el cartucho de corrida que contiene todos los reactivos para la secuenciación de todos los ADN contenidos en cada muestra colectada.

Antes de iniciar la corrida se debe crear una hoja de trabajo para el equipo (Tabla 7)

Tabla 7.

Hoja de trabajo para el equipo utilizado

IEMFileVersion		4			
Date	7/16/2018				
Workflow	Metagenomics				
Application	Metagenomics 16S rRNA				
Assay	Nextera XT				
Description					
Chemistry	Amplicon				
[Reads]					
	301				
	301				
[Settings]					
Adapter	CTGTCTCTTATACACATCT				
[Data]					
Sample_ID	Sample_Name	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2
1	AI-01	N701	TAAGGCGA	S502	CTCTCTAT
2	AI-02	N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
3	AI-03	N703	AGGCAGAA	S502	CTCTCTAT
4	AI-04	N704	TCCTGAGC	S502	CTCTCTAT
5	AI-05	N705	GGACTCCT	S502	CTCTCTAT
6	AI-06	N706	TAGGCATG	S502	CTCTCTAT
7	AI-07	N707	CTCTCTAC	S502	CTCTCTAT
8	AI-08	N708	CAGAGAGG	S502	CTCTCTAT
9	AI-09	N709	GCTACGCT	S502	CTCTCTAT
10	AI-10	N710	CGAGGCTG	S502	CTCTCTAT
11	AI-11	N711	AAGAGGCA	S502	CTCTCTAT
12	AI-12	N712	GTAGAGGA	S502	CTCTCTAT
13	AI-13	N701	TAAGGCGA	S503	TATCCTCT
14	AI-14	N702	CGTACTAG	S503	TATCCTCT
15	AI-15	N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
16	AI-16	N704	TCCTGAGC	S503	TATCCTCT
101	Zymo-positivo	N706	TAGGCATG	S517	GCGTAAGA

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El sistema Illumina demora alrededor de 60 horas en secuenciar una celda V3 de 600 ciclos.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de las bacterias en familias con amelogénesis imperfectas: 2018

El objetivo del presente estudio fue describir el microbioma oral de los miembros de las familias afectadas con amelogénesis imperfecta mediante un análisis del gen 16S por secuenciación de próxima generación (NGS), en un proyecto conjunto de la Facultad de Odontología y el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

Las técnicas estadísticas utilizadas para el análisis de la información son las distribuciones de frecuencia, cruce de variables, comparación de medias con base en el análisis de variancia. El nivel mínimo de confianza para las comparaciones fue del 95 %. Para el procesamiento estadístico de los datos se diseñó una base de datos creada en Excel, en SPSS versión 13.0.

Las técnicas de análisis de datos son el análisis de variancia, con el fin de probar la siguiente hipótesis:

H_0 : Los promedios en las poblaciones son iguales

H_1 : Al menos uno de los promedios es diferente

Cuando se trate de dos distribuciones de variables nominales y ordinales se utilizará la prueba de homogeneidad de distribuciones basada en el estadístico de Kolmogorov – Smirnov¹, o bien con la prueba U de Mann Whitney cuando no se cumplan los supuestos para utilizar pruebas estadísticas paramétricas.

4.2 Características de las familias

Se estudiaron cinco familias que sumaron 16 personas con edades entre los 4 y 25 años; el 65 % eran hombres. Se encontraron con 7 personas afectadas (38 %) con edades entre los 8 y 22 años, de los cuales son 4 hombres y 3 mujeres. En años anteriores se han estudiado alrededor de 16 familias en las que se han encontrado las mutaciones descritas (Tabla 8).

¹ Kolmogorov-Smirnov Z es la prueba estadística que permite probar si dos grupos provienen de poblaciones que tienen la misma distribución.

Tabla 8.*Información de familias en estudio*

<i>Mutación</i>	<i>Patrón de Herencia</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Familia</i>
<i>Ameloblastina (AMBN)</i>	<i>Autosómico recesivo</i>	<i>Hipopláxico</i>	<i>4</i>
<i>Amelotina (AMTN)</i>	<i>Autosómico dominante</i>	<i>Hipopláxico</i>	<i>2</i>
<i>FAM20A</i>	<i>Autosómico recesivo</i>	<i>Hipopláxico</i>	<i>1</i>
<i>LAMB3</i>	<i>Autosómico dominante</i>	<i>Hipopláxico</i>	<i>5</i>
<i>No reportado</i>	<i>No reportado</i>	<i>Hipomineralizado</i>	<i>3</i>

Fuente: Elaboración Propia, 2018.

4.3 Características de los géneros de bacterias

Se clasificó un promedio de 333 géneros de bacterias sin que se encontrara diferencia estadísticamente significativa entre los afectados y los no afectados ($p = 0,895$) ni entre las familias ($p = 0,965$); un 9 % de los géneros no fueron clasificados, independientemente de la afectación ($p = 0,149$) ni entre las familias ($p = 0,118$). Los géneros que se manifestaron con mayor número de pacientes fueron el *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria* y *Haemophilus*. El género más abundante, según el orden de importancia, es el *Streptococcus*, seguido de la *Prevotella*, la *Neisseria* y, por último, la *Actinomyces*, que se encuentra en 7 de los participantes, aunque la posibilidad de producir alguna patología en menor que es los anteriores géneros.

Tabla 9.*Presencia y orden de abundancia según género de bacteria***Presencia y orden de abundancia según género de bacteria.**

Genero de bacteria	Orden de abundancia														Total			
	1		2		3		4		5		6		7				8	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Streptococcus	13	81,3	2	12,5	1	6,3											16	100,0
Prevotella			1	7,7	3	23,1	3	23,1			1	7,7	3	23,1	2	15,4	13	100,0
Neisseria			1	10,0	1	10,0	4	40,0			2	20,0	1	10,0	1	10,0	10	100,0
Haemophilus					1	11,1	1	11,1	2	22,2	2	22,2			3	33,3	9	100,0
Actinomyces								7	87,5			1	12,5				8	100,0
Fusobacterium							1	12,5	1	12,5	1	12,5	3	37,5	2	25,0	8	100,0
Gemella			1	12,5	2	25,0			2	25,0	1	12,5			2	25,0	8	100,0
Rothia					1	14,3					2	28,6	3	42,9	1	14,3	7	100,0
Granulicatella													2	66,7	1	33,3	3	100,0
Leptotrichia											3	100,0					3	100,0
Porphyromonas								1	33,3	1	33,3				1	33,3	3	100,0
Mannheimia													1	50,0	1	50,0	2	100,0
Selenomonas											1	50,0	1	50,0			2	100,0
Actinobacillus							1	100,0									1	100,0
Alicyclobacillus													1	100,0			1	100,0
Atopobium															1	100,0	1	100,0
Megasphaera											1	100,0					1	100,0

Fuente: M.Sc. Jaqueline Castillo, estadística de la Facultad de Odontología-UCR, 2018.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la presencia del género y el orden entre los afectados ($p > 0,005$) ni entre las familias ($p > 0,05$).

Tabla 10.

Asociación entre familias y entre los afectados y no afectados con AI

Asociación entre familias (Kruskal Wallis Test)				Asociación entre afectación (Mann-Whitney)			
Genero	Chi-Square	gl	Sig.	Género	U	Z	Sig.
<u>Actynomyces</u>	3,000	3	0,392	<u>Actynomyces</u>	3	(0,378)	0,705
Fusobacterium	5,708	4	0,222	Fusobacterium	7,5	(0,149)	0,882
<u>Gemella</u>	6,265	4	0,180	<u>Gemella</u>	3,5	(1,214)	0,225
<u>Granulicatella</u>	2,000	2	0,368	<u>Granulicatella</u>	0,5	(0,707)	0,480
Haemophilus	2,889	4	0,577	Haemophilus	6,5	(0,880)	0,379
<u>Leptotrichia</u>	-	1	1,000	<u>Leptotrichia</u>	1	-	1,000
Neisseria	5,459	4	0,243	<u>Mannheimia</u>	0	(1,000)	0,317
Porphyromonas	2,000	2	0,368	Neisseria	11,5	(0,216)	0,829
Prevotella	3,308	4	0,508	Porphyromonas	0	(1,225)	0,221
Rothia	2,882	4	0,578	Prevotella	16	(0,727)	0,467
Streptococcus	2,714	4	0,607	Rothia	3,5	(0,926)	0,354
5 familias				Streptococcus	28,5	(0,467)	0,641

Afectados/no afectados

Fuente: M.Sc. Jaqueline Castillo, estadística de la Facultad de Odontología-UCR, 2018.

Con respecto a las especies se clasificó un promedio de 482 especies en las que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre afectados y no afectados ($p = 0,669$) ni entre las familias ($p = 0,922$); el 35 % de las especies no se clasificaron.

Tabla 11.
Presencia y orden de abundancia según especie de bacteria

Presencia y orden de abundancia según especie de bacteria

Especie de bacteria	Orden de abundancia																Total	
	1		2		3		4		5		6		7		8			
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
<i>Unclassified at species level</i>	16	100															16	100,0
<i>Streptococcus tigurinus</i>			9	69,2	3	23,1	1	7,7									13	100,0
<i>Veillonella atypica</i>			6	50,0	4	33,3	1	8,3	1	8,3							12	100,0
<i>Neisseria mucosa</i>					5	55,6	1	11,1	1	11,1			1	11,1	1	11,1	9	100,0
<i>Streptococcus vestibularis</i>			1	14,3			1	14,3	1	14,3	3	42,9			1	14,3	7	100,0
<i>Veillonella dispar</i>					1	14,3	1	14,3	3	42,9	1	14,3	1	14,3			7	100,0
<i>Gemella cunicula</i>							4	66,7					1	16,7	1	16,7	6	100,0
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>									1	16,7	3	50,0			2	33,3	6	100,0
<i>Mannheimia caviae</i>					1	20,0	1	20,0			1	20,0	2	40,0			5	100,0
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>									3	60,0			2	40,0			5	100,0
<i>Gemellas anguinis</i>									1	25,0	1	25,0			2	50,0	4	100,0
<i>Prevotella histicola</i>							1	25,0					2	50,0	1	25,0	4	100,0
<i>Prevotella melaninogenica</i>							2	50,0	1	25,0					1	25,0	4	100,0
<i>Veillonella montpellierensis</i>					1	25,0					1	25,0	1	25,0	1	25,0	4	100,0
<i>Fusobacterium naviforme</i>					1	33,3			1	33,3					1	33,3	3	100,0
<i>Rothia mucilaginoso</i>											2	66,7	1	33,3			3	100,0
<i>Streptococcus oralis</i>													1	33,3	2	66,7	3	100,0
<i>Veillonella parvula</i>									1	50			1	50			2	100,0

Presencia y orden de abundancia según especie de bacteria

Especie de bacteria	Orden de abundancia														Total				
	1		2		3		4		5		6		7				8		
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	
<i>Actino bacillus parahaemolyticus</i>							1	100,0									1	100,0	
<i>Actinomyces meyeri</i>														1	100,0		1	100,0	
<i>Alicyclobacillus pohliae</i>											1	100,0					1	100,0	
<i>Granulicate elegans</i>											1	100,0					1	100,0	
<i>Lautropia mirabilis</i>																1	100,0	1	100,0
<i>Leptotrichia hofstadii</i>									1	100,0							1	100,0	
<i>Leptotrichia wadei</i>																1	100,0	1	100,0
<i>Megasphaera micronuciformis</i>									1	100,0							1	100,0	
<i>Neisseria flavescens</i>														1	100,0		1	100,0	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>														1	100,0		1	100,0	
<i>Prevotella multiformis</i>											1	100,0					1	100,0	
<i>Prevotella oris</i>																1	100,0	1	100,0
<i>Selenomonas infelix</i>							1	100,0									1	100,0	
<i>Streptococcus infantis</i>											1	100,0					1	100,0	
<i>Streptococcus parasanguinis</i>							1	100,0									1	100,0	

Fuente: M.Sc. Jaqueline Castillo, estadística de la Facultad de Odontología-UCR, 2018.

No se presentó diferencia estadísticamente significativa entre las especies afectación ($p > 0,05$) ni entre familias ($p > 0,05$).

Tabla 12.*Asociación entre afectados y no afectados*

Asociación entre afectación (Mann Whitney)			
Especie	Valor	Z	Sig.
<i>Fusobacterium naviforme</i>	1	-	1,000
<i>Gemella cunicula</i>	2,5	(0,822)	0,411
<i>Gemella sanguinis</i>	1	(0,471)	0,637
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3	(0,500)	0,617
<i>Mannheimia caviae</i>	0	(1,777)	0,076
<i>Neisseria mucosa</i>	9	(0,268)	0,788
<i>Prevotella histicola</i>	1,5	-	1,000
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0	(1,633)	0,102
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	2,5	(0,333)	0,739
<i>Streptococcus tigurinus</i>	15	(1,056)	0,291
<i>Streptococcus vestibularis</i>	4	(0,402)	0,688
<i>Unclassifiedat speciesleve</i>	31,5	-	1,000
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	(1,342)	0,180
<i>Veillonella atypica</i>	14,5	(0,278)	0,781
<i>Veillonella dispar</i>	1	(1,038)	0,299

Fuente: M.Sc. Jaqueline Castillo, estadística de la Facultad de Odontología-UCR, 2018.

4.2 Discusión

Amelogénesis imperfecta es una condición que se manifiesta en una variación del esmalte con manifestaciones clínicas y radiográficas debido a alteraciones genéticas, donde la estructura adamantina es de pobre desarrollo o ausencia completa del esmalte, causado por la diferenciación impropia de los ameloblastos. Esta condición se debe a una función anormal de los ameloblastos o a una alteración en el depósito estructural y la calcificación de la matriz del esmalte, causando una variación en el grado de mineralización de las piezas dentales.

Este es un estudio descriptivo de la comunidad bacteriana, en el cual se da un primer acercamiento al análisis del microbiota oral en familias bajo estudio, en un proyecto general de amelogénesis imperfecta. El propósito se basa en identificar la posible diferencia entre el contenido y cantidad bacteriana entre sujetos afectados, no afectados y entre familias.

Se contó con familias previamente involucradas en la línea de investigación de amelogénesis imperfecta (AI), desarrollada por la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica en colaboración con la Universidad de Leeds de Inglaterra, cuyas mutaciones se han identificado anteriormente. No se conoce la mutación de la cuarta familia, ya que aún se encuentra en estudio.

Es importante destacar que se contó con el aporte de la base de datos denominada Greengenes, la cual es una base de datos que se encarga de la secuenciación bacteriana a partir del ribosoma 16S de toda la comunidad bacteriana y del reino *Archaea*. La clasificación se basa en una construcción y mapeo del *ranking* automático de otras base de datos como lo es la NCBI, el árbol filogenético se obtiene a partir del ARNr 16S que, a su vez, se adquiere de una base de datos públicos que han pasado por un filtro de calidad. Las secuencias son alineadas por caracteres, estructuras secundarias y luego sometidas a una construcción por medio de FastTree. Los nodos internos son automáticamente asignados a rangos taxonómicos del NCBI el CyanoDB y una versión previa del Greengenes. Esta brinda información valiosa sobre la clasificación por géneros, especies y número de lecturas de la secuencia de ADN bacteriano.

En este estudio se demostró que el tener un conjunto o mayor cantidad de bacterias no determina que sea directamente proporcional a la relación con una enfermedad o patología, en este caso amelogénesis imperfecta. Resulta importante comprender como una sola bacteria por sí misma no denota una patología como tal, sino que la presencia de un conjunto de ellas puede favorecer y ser agente causal, a la vez, de dicha enfermedad. Esto es relevante para entender como las bacterias trabajan en conjunto y como una patología puede, independientemente, a interaccionar entre ellas.

Se puede establecer, por estudios previos, que entre los posibles patógenos que causan o están asociados a la caries dental se encuentra el *Streptococcus mutans* y la *Prevotella*, mientras que la *Prevotella denticola* y el *Actinomyces* se consideran factores importantes en la formación de caries radicular.

Es significativo destacar ciertas características de los géneros de bacterias más importantes tanto en abundancia como en frecuencia de la presente investigación, el género de *Streptococcus* se presentó como principal tanto en importancia como en prevalencia en pacientes afectados como no afectados; las especies de este género se pueden clasificar en Gram negativo y en Gram positivo, pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas. Este género produce en seres humanos desde patologías relativamente leves, por ejemplo la caries dental, hasta manifestaciones más graves como el impétigo, que es un síndrome de choque tóxico o la fascitis necrotizante. Se pueden encontrar en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua.

Se destaca a la *Prevotella* como segunda en importancia encontrada en los sujetos de estudio. Esta se clasifica como Gram negativo, anaerobia, asociada a procesos de gingivitis a nivel oral, desarrollo de la enfermedad periodontal e infecciones orales. Se puede asociar la alta presencia de esta con hábitos deficientes de higiene en los pacientes que participaron en el estudio.

En tercer lugar, presente en abundancia y frecuencia se encontró la *Neisseria*. Esta bacteria pertenece al grupo de los Gram negativos aerobias, perteneciente a las procariontas beta, se presentan dos formas patógenas, la *Neisseria gonorrhoeae* causante de la gonorrea y *Neisseria meningitidis* una de las causas más comunes de la meningitis, sensibles a altas temperaturas, desecación y metales pesados.

Los *actinomicetes* se encuentran en cuarto lugar de importancia y abundancia en el estudio. Las especies del género *Actinomyces* son de tipo Gram positivo, son anaerobias facultativas. Muchos *actinomicetes* son patógenos oportunistas de los seres humanos, particularmente en la cavidad oral. En raros casos, se puede producir actinomicosis a causa de estas bacterias, una enfermedad que se caracteriza por la formación de abscesos en la boca. Se encuentran a nivel supragingival e infragingival y en fisuras de la lengua.

Todas las bacterias descritas anteriormente, según los resultados estadísticos, en relación con la abundancia y la frecuencia, se encontraron tanto en sujetos afectados como en no afectados y entre familias sin una diferencia estadísticamente significativa. Esto se debe a varios motivos; en primer lugar, al número de casos, debido a que se estudiaron cinco familias con individuos afectados y no afectados dentro de ellas. También existe un 50 % de bacterias que no se clasificaron, ya que la base de datos utilizada para la investigación no cuenta con las secuencias de información para identificarlas, debido a la extensa cantidad de géneros y especies bacterianas presentes en sujetos humanos.

Los individuos con esta afectación (AI) poseen una estructura en posición de un posible esmalte dental no formado con micronichos en la mayoría de los fenotipos, que pueden resultar en un mayor acúmulo de bacterias, según la hipótesis planteada en el proyecto.

La microbiota o microbioma es el ecosistema de bacterias que habitan por dentro y fuera del cuerpo humano. Se pueden encontrar en mucosas y piel, pero la mayor parte de ellas están en el intestino (lo que suele llamarse flora intestinal). El microbioma es tan importante para la salud y evolución que algunos investigadores lo llaman «órgano» y «genoma extendido». A pesar de ser tan pequeños, su población es muy

extensa; por cada célula humana hay 10 microorganismos y por cada gen humano 100 genes en el microbioma. Esto significa que mientras todos los humanos tienen códigos genéticos muy parecidos, el microbioma de un individuo es completamente diferente al de otro.

Estudios poblacionales han utilizado técnicas genómicas basadas en secuenciación del gen ribosomal 16S (rRNA 16S), han confirmado que las principales especies aisladas en la cavidad oral son *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteriodes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. Siendo los más frecuentes *Prevotella*, *Selenomonas* y *Streptococcus*, lo cual se vio reflejado en el presente estudio; dentro de las bacterias más frecuentes se contó con el *Streptococcus* en primer lugar, como ya se mencionó; además de la *Prevotella* y la *Neiseria* figurando en los primeros lugares de importancia. Cabe destacar que el género del *Streptococcus* es el que más se ha reportado como el preponderante a nivel de cavidad oral y se han diferenciado más de 16 especies de esta bacteria, siendo las más frecuentes *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, presentes también en los sujetos de estudio.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En el análisis de la secuenciación del ADN (microbioma 16S) de cada una de las muestras de los sujetos de estudio se logró identificar mayor abundancia y prevalencia, en orden descendente, de bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Gemella* y *Rothia*, figurándose entre las ocho más sobresalientes.

Se identificó que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) del contenido bacteriológico entre pacientes afectados y no afectados, presentándose similitud entre abundancia y prevalencia de las comunidades bacterianas, según los resultados de la base de datos Greengenes.

Estudiantes de la maestría en Bioinformática desarrollan un análisis bioinformático complejo en el que incluirán, además de los datos del microbioma, los metadatos de los participantes.

Además, se puede señalar que no se logró identificar una gran cantidad de bacterias, dado que la base de datos que se utilizó para la secuenciación del microbioma oral tiene un límite en amplitud e identificación de bacterias, por lo que no hay certeza si existe diferencia significativa entre afectados, no afectados y entre las familias del estudio pues, según los resultados de la base de datos Greengenes, un porcentaje considerable de contenido bacteriano oral no se identificó.

Al analizar solo el contenido bacteriológico, no se cuenta con información de otras variables como la higiene oral, edad, sexo y cuantificación de biofilme con la que se pueda realizar estudios de comparación en un futuro, lo que daría más información sobre estas familias.

5.2 Recomendaciones

Realizar este proyecto con un mayor número de casos, para que no se afecten los procesos estadísticos y no sea un factor que influya dentro de los resultados.

Continuar con el proceso de investigación, para realizar futuros proyectos sobre la amelogenesis imperfecta y su relación con la microbiota oral; documentar más aspectos sobre este padecimiento que afecta a tantas familias y que es una línea interesante y vigente de investigación.

Mantener esta línea de investigación de microbiota oral entre sujetos afectados y no afectados, en donde se logre realizar un análisis de secuenciación con bases de datos más completas, que permitan identificar la mayor cantidad de comunidades bacterianas.

Mantener la colaboración con distintas instituciones que puedan brindar y fortalecer el proceso de investigación que se lleva a cabo en la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica.

Es deber de todo profesional en Odontología conocer sobre la condición de la amelogenesis imperfecta, sus implicaciones y su correcto abordaje, para poder brindar a los pacientes una mejor calidad de vida.

Referencias bibliográficas

1. Revuelta R. La cavidad bucal del nacimiento a la infancia, patologías y cuidados. *Perinatol Reprod Hum.* 2009; 23(2): 82-89
2. Martínez F. Embriología del macizo facial. *Labor Dental.* 2009; 10(2): 72-76
3. Trowbridge H. Review of dental pain histology and physiology. *J Endod.* 1985; 12: 445- 52.
4. Bartlett JD, Simmes JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Gral Biol Med.* 2001; 10(4): 25-41.
5. Osborn JM, Tencate AR. Dentine sensivity. En: *Advances dental histology.* 4th ed. Bristol: Editorial Wright PSG; 2003. p. 109-17.
6. Arraigada E. Embriología e histoembriología bucodentaria. [Internet] [consultado 26 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.idap.com.mx/apuntes/embriología/odontogénesis%2810%29.doc>
7. Pérez N. Esmalte y amelogénesis [Internet]. *Es.slideshare.net.* 2018 (en línea) (Fecha de acceso 8 marzo 2018). Disponible en: <https://es.slideshare.net/dentistanico/esmalte-y-amelogenesis>
8. Gonzales Pinedo CO, Miguel del Priego GP. Amelogénesis imperfecta. criterios de clasificación y aspectos genéticos. *Revista Estomatológica Herediana.* 2009; 19:55-62.
9. Murillo G., Silva S., Mata M, & Esquivel M. Amelogénesis imperfecta: Probabilidad genética de expresión en futuras generaciones de familias costarricenses. *Odovtos Int. J. Dental S.C.* 2014; 16: 71-86.
10. Murillo K, Gamboa L, Morales F, Meza A, López A. impacto emocional y en calidad de vida de individuos afectados por amelogénesis imperfecta. *Odovtos Int. J. Dental S.C.;* 2015; 17(3): 73-85.
11. Turkün L. Conservative restoration with resin composites of a case of amelogenesis imperfecta. *Int Dent J.* 2005; 55(1): 38-41, 2005

12. Jans GA, Sandoval P, Díaz JA, Vergara CV, Zaror C, Acevedo C. Amelogénesis imperfecta: a propósito de un caso. *Acta Odontol Venez.* 2013; 51(1).
13. Murillo G, Cob B, Mena N, Valverde A, Barrantes B, Berrocal A, Silva S. Hallazgos fenotípicos por imágenes con tomografía dental volumétrica (tdv) en amelogénesis imperfecta. *Odovtos Int. J. Dental S.C.* 2016; 18(1): 83-91.
14. Hurtado P, Tobar F, Osorio J, Orozco I, Moreno F. Amelogénesis imperfecta: revisión de la literatura. *Revista Estomatología.* 2015; 23(1): 32-41.
15. Poulter J, Murillo Brookes S, Smith C, Parry D, Silva S, Kirkham J, Inglehearn C, Mighell A. Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet [Internet] [Consultado 20 de junio 2018]; 20(23): 5317-5324.* Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168819/>
16. Smith C, Murillo G, Brookes S, Poulter J, Silva S, Kirkham J, Inglehearn C, Mighell A. Deletion of amelotin exons 3–6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet [Internet] [Consultado 20 de junio 2018]; 25(16): 3578-3587.* Disponible en <https://academic.oup.com/hmg/article/25/16/3578/2525821>
17. Poulter J, Smith C, Murillo G, Silva S, Feather S, Howell M, Crinnion L, Bonthron D, Carr I, Watson C, Inglehearn C, Mighell A. A distinctive oral phenotype points to FAM20A mutations not identified by Sanger sequencing. *Mol Genet Genomic Med. [Internet] [Consultado 20 de mayo 2018]; 3(6): 543-549.* Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694127/>
18. Martín J, Sánchez B, Tarilonte ML, Castellanos L, Llamas JM, López FJ, Segura JJ. Anomalías y displasias dentarias de origen genético-hereditario. *Av. Odontoestomatol.* 2012; 28(6): 287-301.
19. Shields ED, Bixler D, El-Kafrawy AM. A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Arch Oral Biol.* 1973;18: 543-53.
20. Li GW, Xie XS. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature.* 2011; 475(7356): 308-315
21. Barron J, McDonnell S, Mackie I, Dixon M. Hereditary dentine disorders: dentinogénesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet.* 2008; 3: 31.

22. Kesti T, Flick K, Keränen S, Syväoja JE, Wittenberg C. DNA polymerase ϵ catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. *Molecular cell*. 1999; 3(5): 679-685.
23. Koepsel RR, Khan SA. Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science*. 1986; 233(4770): 1316-1318
24. ENCODE Project Consortium, Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012; 489: 57–74. doi:10.1038/nature11247
25. Bustamante C, Cheng W, Mejía YX. Revisiting the central dogma one molecule at a time. *Cell*. 2011; 144(4): 480-497.
26. Desamparados M, Mira A, Camelo A, Simon A. La microbiota oral [Internet]. Researchgate. 2016 [consultado 20 june 2018]. Disponible en https://www.bing.com/cr?IG=F76A3B61859E448CBFBE406AF6131D0B&CID=15DCD7C0C3EB6C072731DBD9C2166DEB&rd=1&h=8PwkdohCZwhpwGvN3qPhQ3_KXOoh4Rww0Wsz_5IjUs&v=1&r=https%3a%2f%2fwww.researchgate.net%2fpublication%2f315812028_La_microbiota_oral&p=DevEx.LB.1,5549.1
27. Serrano HA, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev. CES Odont*. 2015; 28(2): 112-118
28. López J, Basantes C, Sanz A, Suárez S, García M, Fernández C, et al. Microbiología Oral-La cavidad oral como hábitat para los microorganismos [Internet] Microral.wikispaces.com; 2018 [Consultado el 01 june 2018]. Disponible en https://microral.wikispaces.com/La_cavidad_oral_como_habitat_para_los_microorganismos
29. El Microbioma Humano y su Importancia para la Salud [Internet]. La Vida Orgánica; 2017 [Consultado el 22 june 2018]. Disponible en <https://www.lavidaorganic.com/blog/2017/10/17/el-microbioma-humano-y-su-importancia-para-la-salud>
30. Dewhirst F, Chen T, Izard J, Paster B, Tanner A, Yu W et al. The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*. 2010; 192(19): 5002-5017.

31. Sultan A, Kong E, Rizk A, Jabra-Rizk M. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLOS Pathogens*. 2018; 14(1): e1006719.
32. Jenkinson H. Beyond the oral microbiome. *Environmental Microbiology*. 2011; 13(12): 3077–3087
33. Cruz S, Díaz P, Arias D, Mazón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal [Internet]. *Scielo.sld.cu*; 2018 [Consultado el 25 may 2018]. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000100008
34. Coll H, Jiménez M, Castro N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Revistas.ces.edu.co*; 2018 [Internet] [Consultado el 27 may 2018]. Disponible en <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3681>
35. Zheng H, Xu L, Wang Z, Li L, Zhang J, Zhang Q, et al. Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep*. 2015; 16;5: 10948. doi: 10.1038/srep10948.
36. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*. 2012; 39: 425-33. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x
37. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22(4): 238-45
38. Julian P. Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica. [Internet]. Universidad del País Vasco, España; 2012. Disponible en <http://hdl.handle.net/10810/8262>
39. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72(7): 5069-5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
40. Arena M, Chiappa F. Microbiología ambiental en México: Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad. [Internet]. Yucatán, México: Universidad

Nacional Autónoma de México; octubre 2017. [Consultado 20 de junio 2018].
Disponible en
https://www.researchgate.net/profile/Kadiya_Calderon/publication/322370039_UNA_M_Libro_Microbiologia_final_con_ISBN/links/5a568a5c45851547b1bf1fb5/UNAM-Libro-Microbiologia-final-con-ISBN.pdf

41. Aguilar L & Falquetll L. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev. Salud Anim.* 2015; 37(2): 125-132
42. MacDougall, M. , Simmons, D. , Gu, T. T., Forsman-Semb, K. , Kärrman Mårdh, C. , Mesbah, M. , Forest, N. , Krebsbach, P. H., Yamada, Y. and Berdal, A. (2000), Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *European Journal of Oral Sciences*, 108: 303-310. doi:[10.1034/j.1600-0722.2000.108004303.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.108004303.x)
43. Poulter J, El-Sayed W, Shore R, Kirkham J, Inglehearn C, and Mighell AJ. Poulter J et al. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(1): 132–135.

Anexos



16S Metagenomics Report

Sample: AI-01

Report Date: 08/31/2018 18:16:47 (UTC)

Sample Configuration

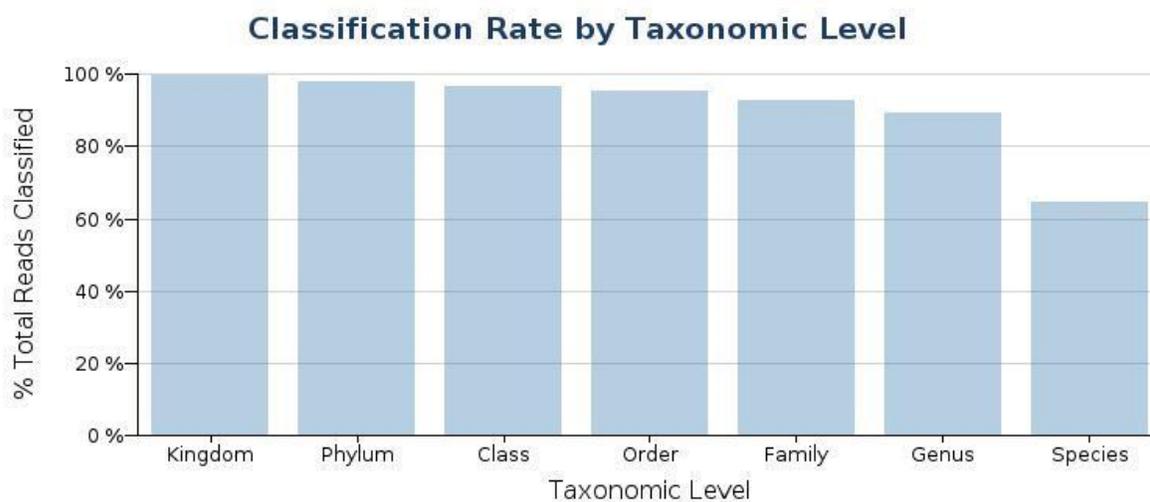
Sample ID:	1
Sample Name:	AI-01
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
74,179	74,179	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	74,026	99.79 %
Phylum	72,787	98.12 %
Class	71,532	96.43 %
Order	70,617	95.20 %
Family	68,659	92.56 %
Genus	66,349	89.44 %
Species	48,064	64.79 %



Classification Results by Taxonomic Level

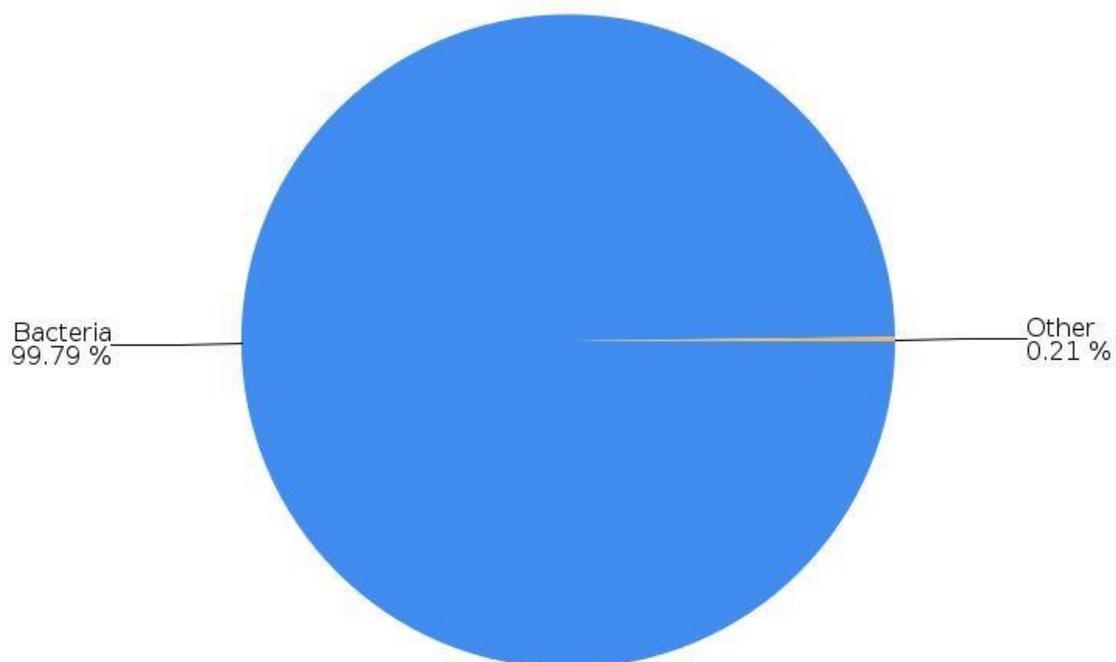
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

1 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	74,026	99.79 %
Unclassified at Kingdom level	153	0.21 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



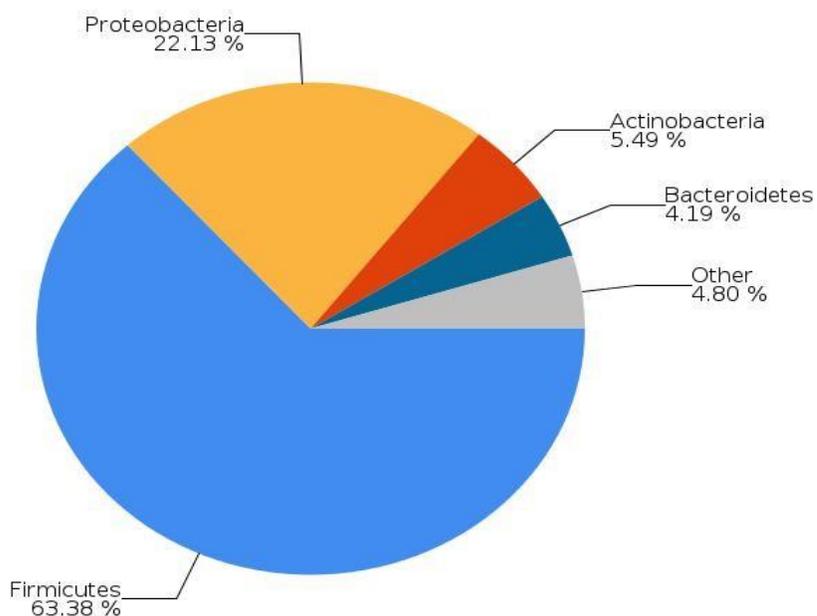
2 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	47,014	63.38 %
Proteobacteria	16,419	22.13 %
Actinobacteria	4,071	5.49 %
Bacteroidetes	3,111	4.19 %
Fusobacteria	1,930	2.60 %
Unclassified at Phylum level	1,392	1.88 %
Spirochaetes	67	0.09 %
Verrucomicrobia	45	0.06 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 20. This table shows the top 8 of 20 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



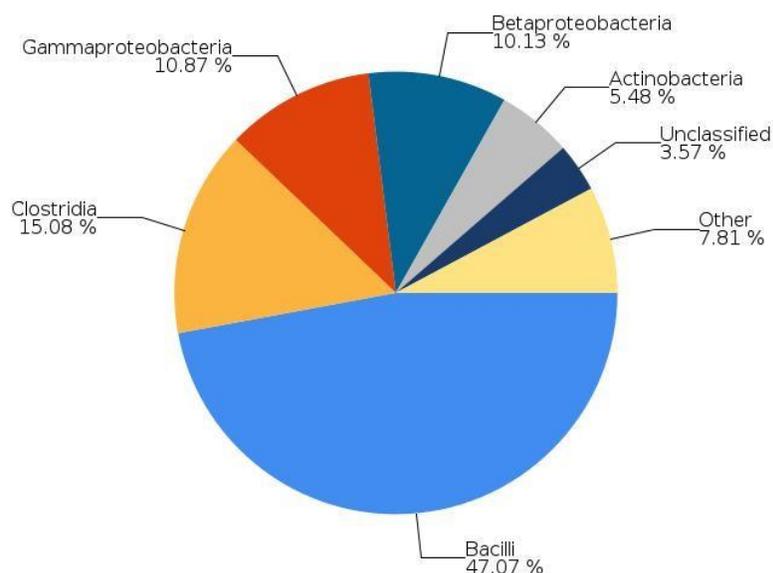
3 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	34,919	47.07 %
Clostridia	11,183	15.08 %
Gammaproteobacteria	8,061	10.87 %
Betaproteobacteria	7,515	10.13 %
Actinobacteria	4,062	5.48 %
Unclassified at Class level	2,647	3.57 %
Bacteroidia	2,421	3.26 %
Fusobacteria	1,930	2.60 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 34. This table shows the top 8 of 34 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 %

Top Class Classification Results



abundance.

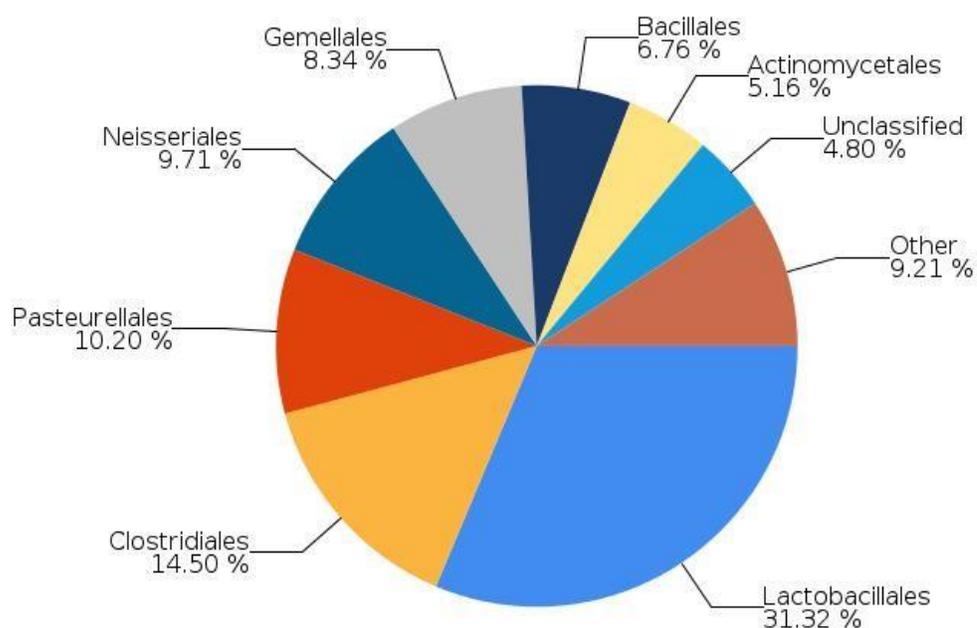
4 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	23,234	31.32 %
Clostridiales	10,753	14.50 %
Pasteurellales	7,567	10.20 %
Neisseriales	7,205	9.71 %
Gemellales	6,189	8.34 %
Bacillales	5,013	6.76 %
Actinomycetales	3,826	5.16 %
Unclassified at Order level	3,562	4.80 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 77. This table shows the top 8 of 77 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



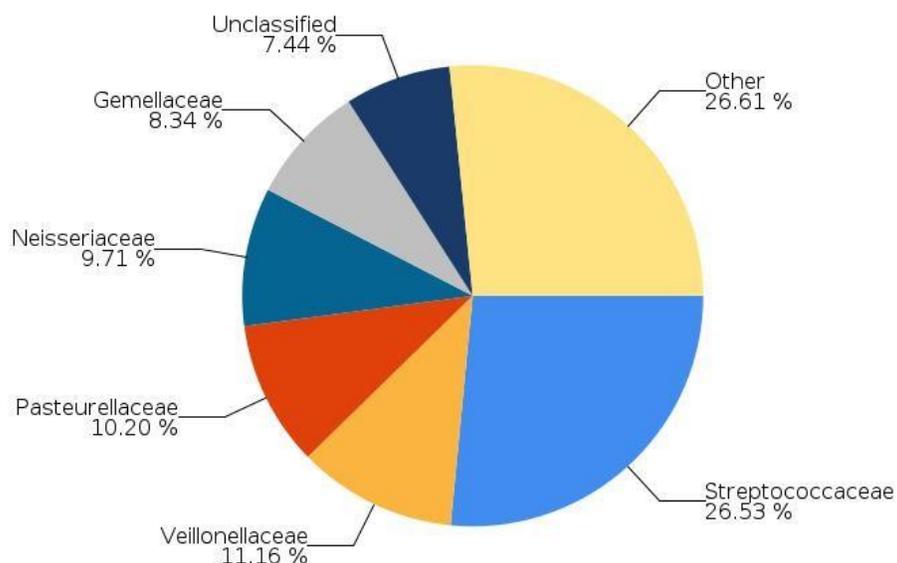
5 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	19,682	26.53 %
Veillonellaceae	8,277	11.16 %
Pasteurellaceae	7,567	10.20 %
Neisseriaceae	7,205	9.71 %
Gemellaceae	6,189	8.34 %
Unclassified at Family level	5,520	7.44 %
Alicyclobacillaceae	2,277	3.07 %
Carnobacteriaceae	2,061	2.78 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 165. This table shows the top 8 of 165 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



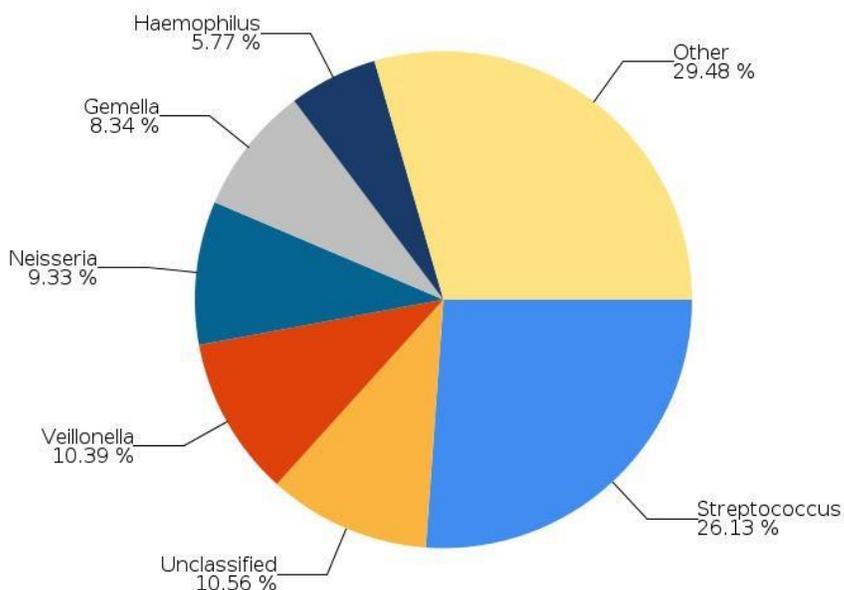
6 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	19,384	26.13 %
Unclassified at Genus level	7,830	10.56 %
Veillonella	7,709	10.39 %
Neisseria	6,922	9.33 %
Gemella	6,189	8.34 %
Haemophilus	4,277	5.77 %
Alicyclobacillus	2,277	3.07 %
Granulicatella	1,904	2.57 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 328. This table shows the top 8 of 328 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



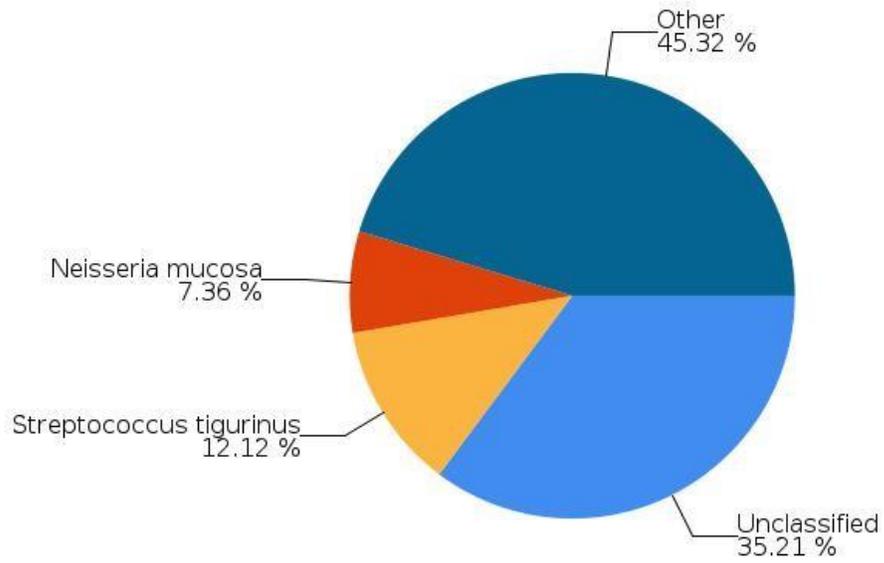
7 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	26,115	35.21 %
<i>Streptococcus tigurinus</i>	8,987	12.12 %
<i>Neisseria mucosa</i>	5,460	7.36 %
<i>Gemella cunicula</i>	2,551	3.44 %
<i>Veillonella atypica</i>	2,499	3.37 %
<i>Alicyclobacillus pohliae</i>	2,277	3.07 %
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1,741	2.35 %
<i>Gemella sanguinis</i>	1,467	1.98 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 469. This table shows the top 8 of 469 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-02

Report Date: 08/31/2018 18:16:55 (UTC)

Sample Configuration

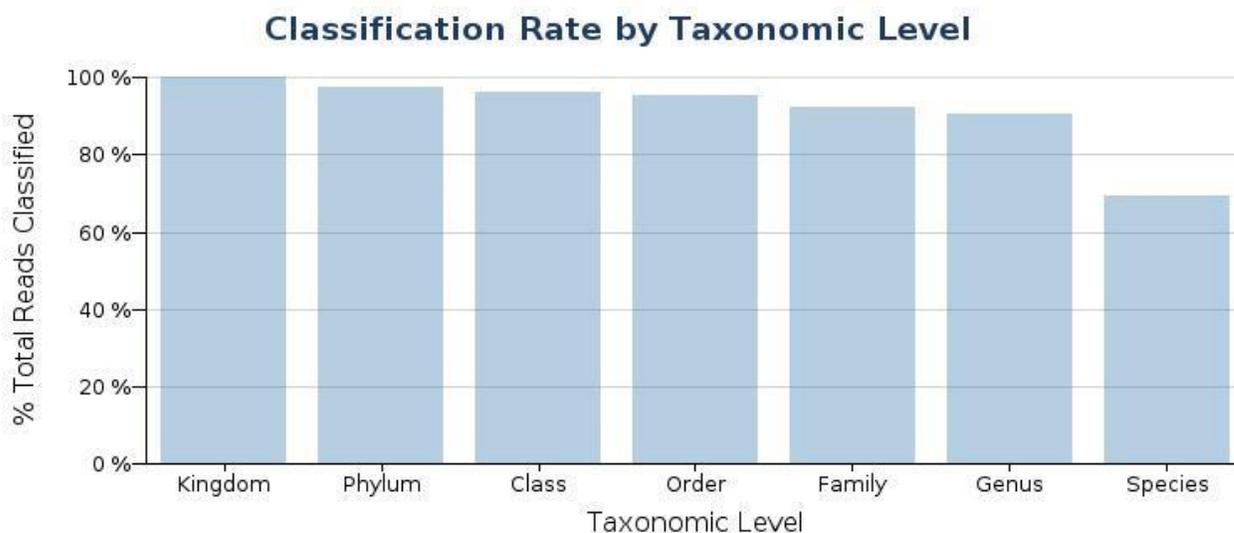
Sample ID:	2
Sample Name:	AI-02
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
69,578	69,578	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	69,513	99.91 %
Phylum	67,961	97.68 %
Class	66,866	96.10 %
Order	66,262	95.23 %
Family	64,302	92.42 %
Genus	62,879	90.37 %
Species	48,419	69.59 %



Classification Results by Taxonomic Level

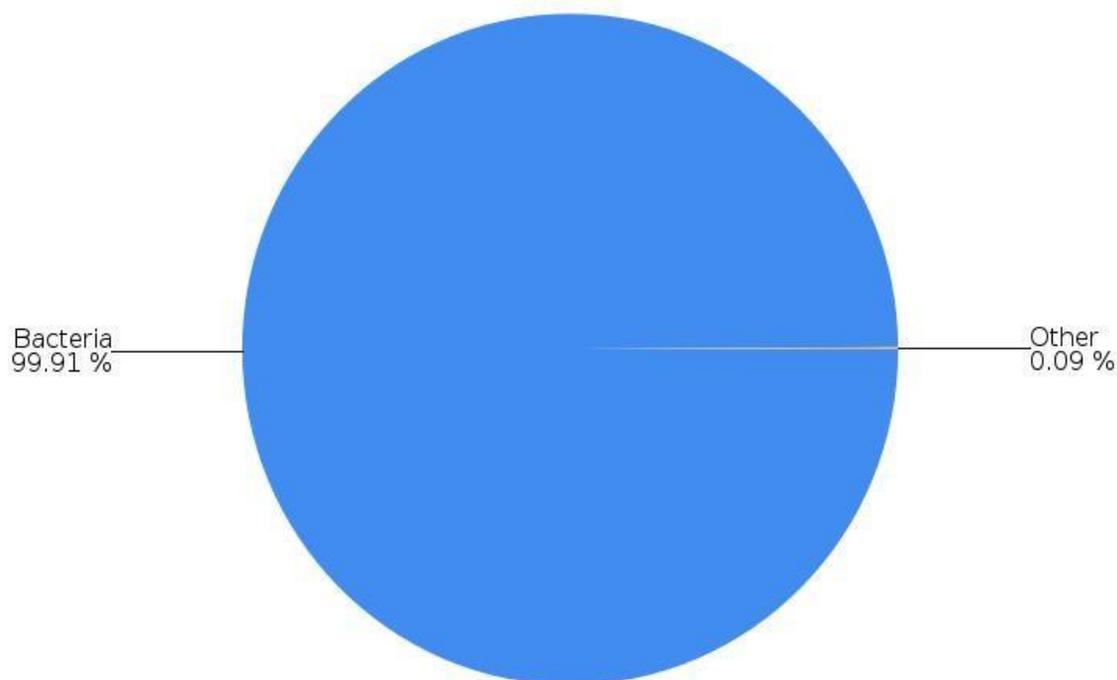
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

8 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	69,513	99.91 %
Unclassified at Kingdom level	65	0.09 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results

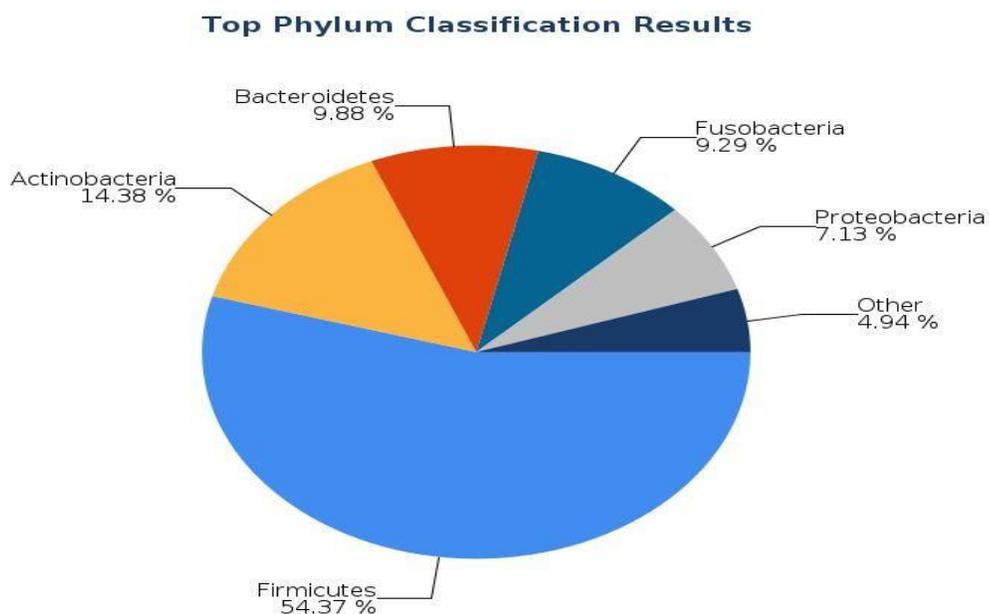


9 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	37,832	54.37 %
Actinobacteria	10,006	14.38 %
Bacteroidetes	6,873	9.88 %
Fusobacteria	6,463	9.29 %
Proteobacteria	4,964	7.13 %
Unclassified at Phylum level	1,617	2.32 %
Spirochaetes	1,241	1.78 %
Cyanobacteria	184	0.26 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 20. This table shows the top 8 of 20 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.



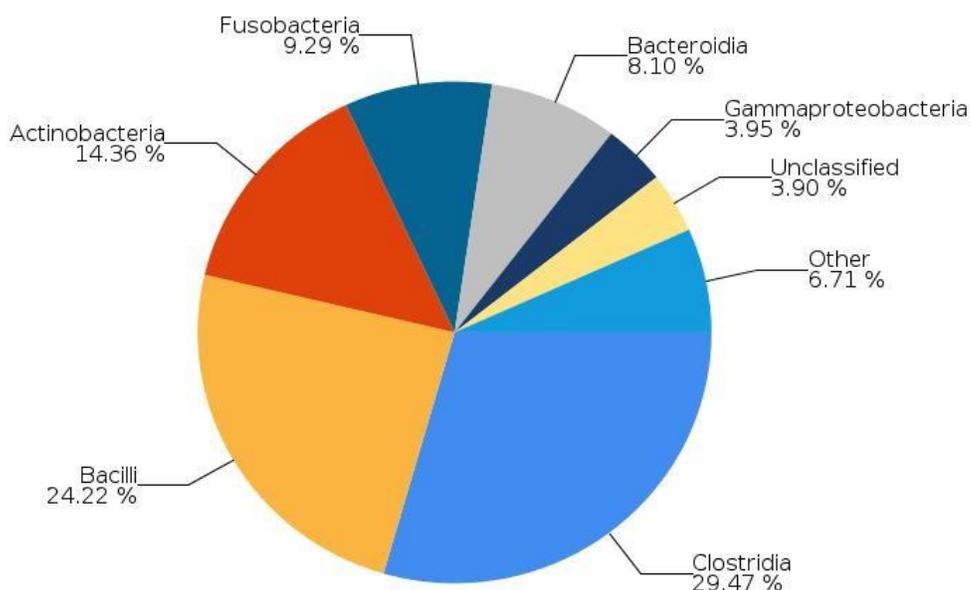
10 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridia	20,504	29.47 %
Bacilli	16,853	24.22 %
Actinobacteria	9,989	14.36 %
Fusobacteria	6,463	9.29 %
Bacteroidia	5,638	8.10 %
Gammaproteobacteria	2,751	3.95 %
Unclassified at Class level	2,712	3.90 %
Spirochaetes	1,240	1.78 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 35. This table shows the top 8 of 35 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



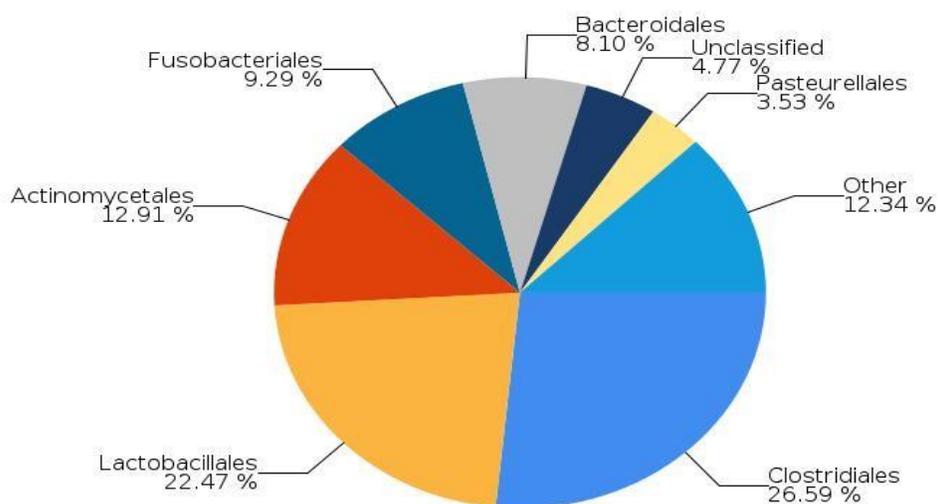
11 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridiales	18,499	26.59 %
Lactobacillales	15,637	22.47 %
Actinomycetales	8,984	12.91 %
Fusobacteriales	6,463	9.29 %
Bacteroidales	5,638	8.10 %
Unclassified at Order level	3,316	4.77 %
Pasteurellales	2,458	3.53 %
Coriobacteriales	1,679	2.41 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 76. This table shows the top 8 of 76 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



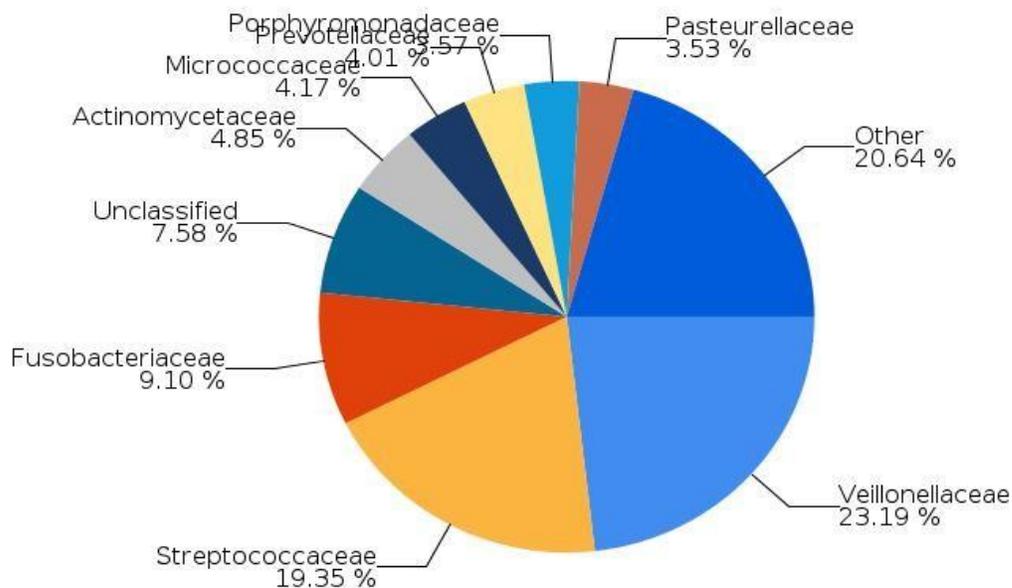
12 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonellaceae	16,132	23.19 %
Streptococcaceae	13,463	19.35 %
Fusobacteriaceae	6,329	9.10 %
Unclassified at Family level	5,276	7.58 %
Actinomycetaceae	3,378	4.85 %
Micrococcaceae	2,904	4.17 %
Prevotellaceae	2,789	4.01 %
Porphyromonadaceae	2,486	3.57 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 162. This table shows the top 8 of 162 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



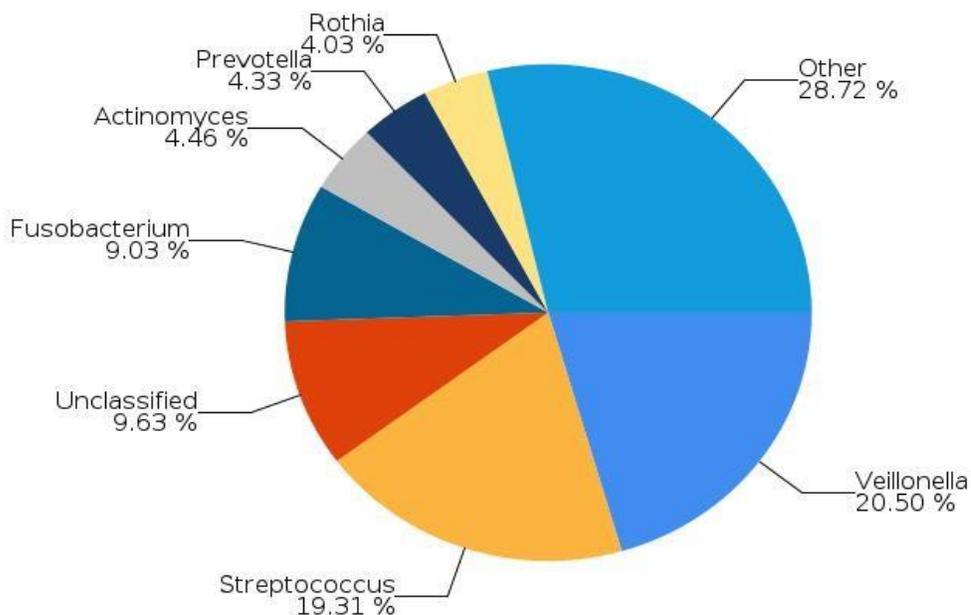
13 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonella	14,262	20.50 %
Streptococcus	13,433	19.31 %
Unclassified at Genus level	6,699	9.63 %
Fusobacterium	6,284	9.03 %
Actinomyces	3,100	4.46 %
Prevotella	3,012	4.33 %
Rothia	2,803	4.03 %
Porphyromonas	1,704	2.45 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 318. This table shows the top 8 of 318 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



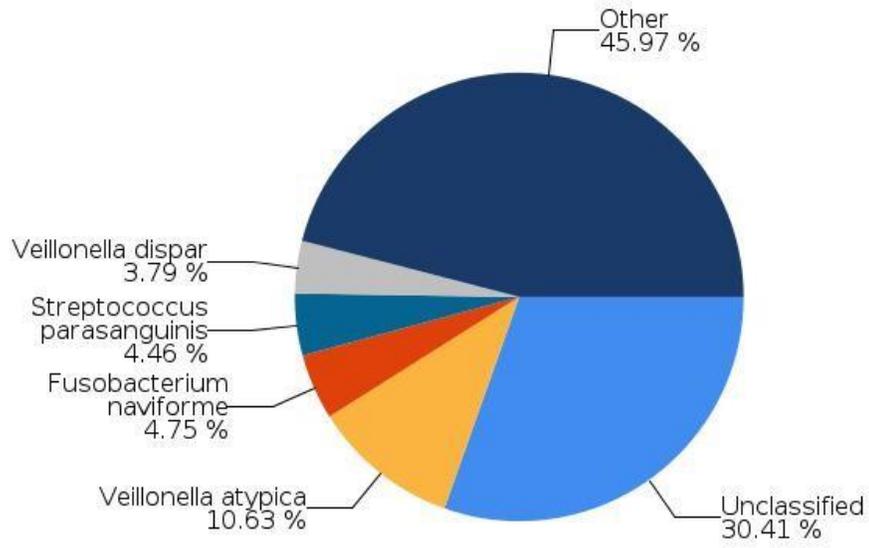
14 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	21,159	30.41 %
<i>Veillonella atypica</i>	7,397	10.63 %
<i>Fusobacterium naviforme</i>	3,302	4.75 %
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	3,104	4.46 %
<i>Veillonella dispar</i>	2,634	3.79 %
<i>Streptococcus vestibularis</i>	2,152	3.09 %
<i>Rothia mucilaginosa</i>	1,795	2.58 %
<i>Prevotella oris</i>	1,743	2.51 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 464. This table shows the top 8 of 464 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance

Top Species Classification Results



illumina[®]

16S Metagenomics Report

Sample: AI-03

Report Date: 08/31/2018 18:16:59 (UTC)

Sample Configuration

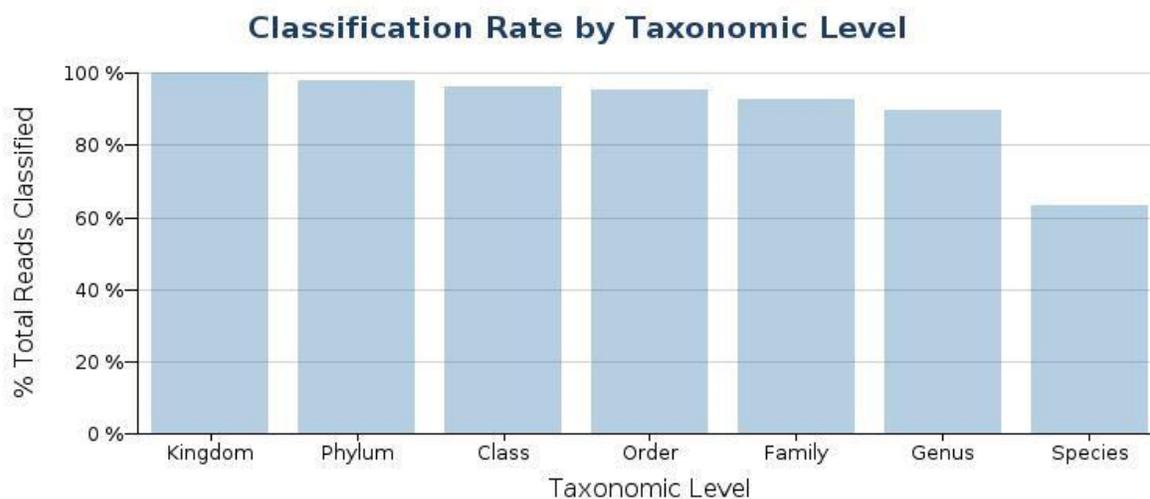
Sample ID:	3
Sample Name:	AI-03
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
16,397	16,397	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	16,388	99.95 %
Phylum	16,057	97.93 %
Class	15,797	96.34 %
Order	15,605	95.17 %
Family	15,180	92.58 %
Genus	14,698	89.64 %
Species	10,364	63.21 %



Classification Results by Taxonomic Level

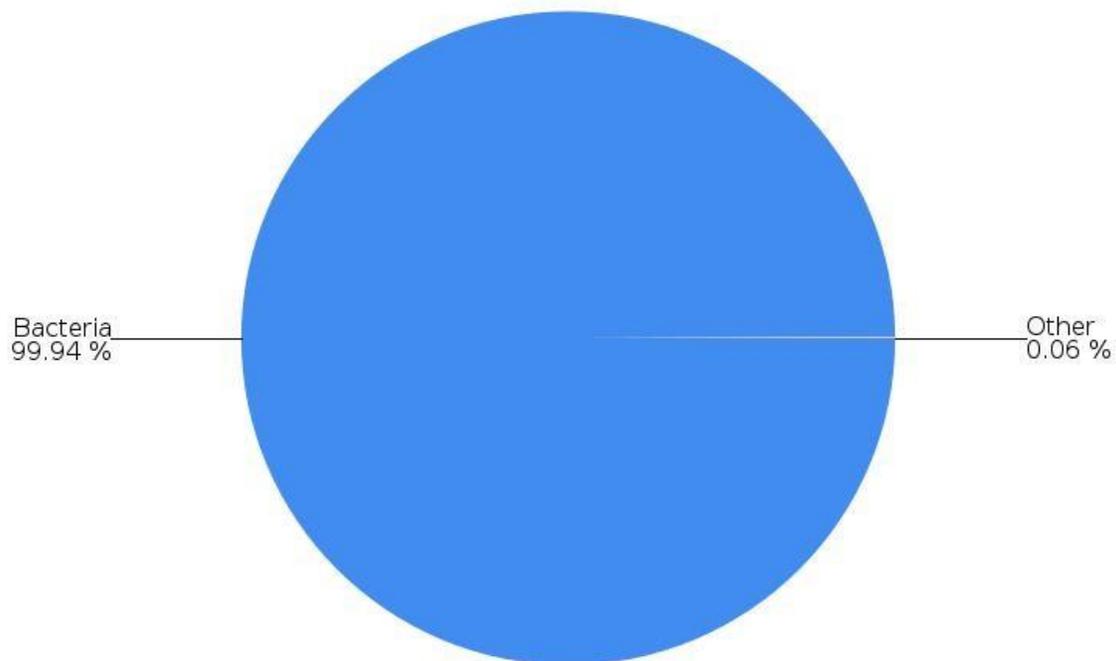
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

15 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	16,387	99.94 %
Unclassified at Kingdom level	9	0.05 %
Archaea	1	0.01 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



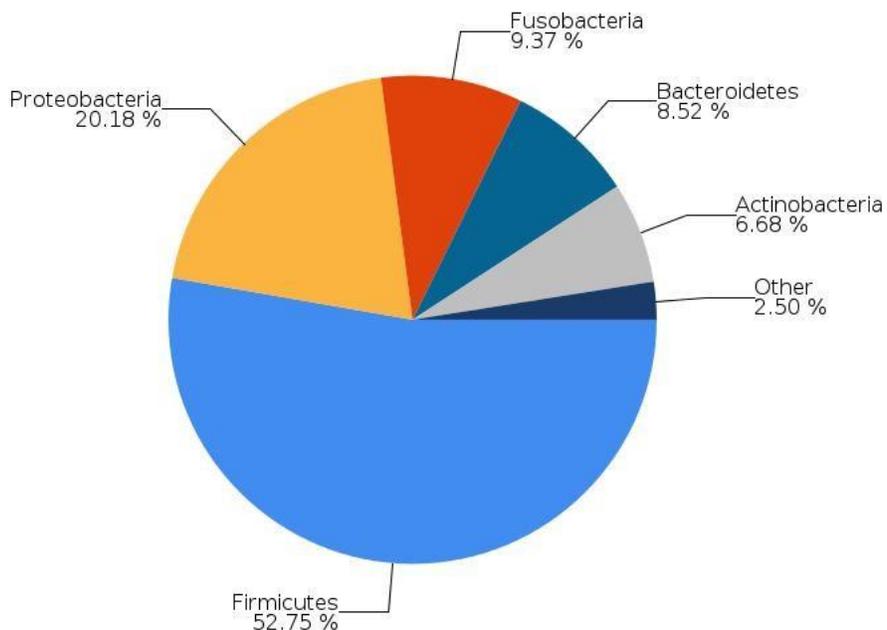
16 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	8,649	52.75 %
Proteobacteria	3,309	20.18 %
Fusobacteria	1,536	9.37 %
Bacteroidetes	1,397	8.52 %
Actinobacteria	1,096	6.68 %
Unclassified at Phylum level	340	2.07 %
Spirochaetes	15	0.09 %
Cyanobacteria	14	0.09 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 17. This table shows the top 8 of 17 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



17
18
19
20
21
22
23
24
25

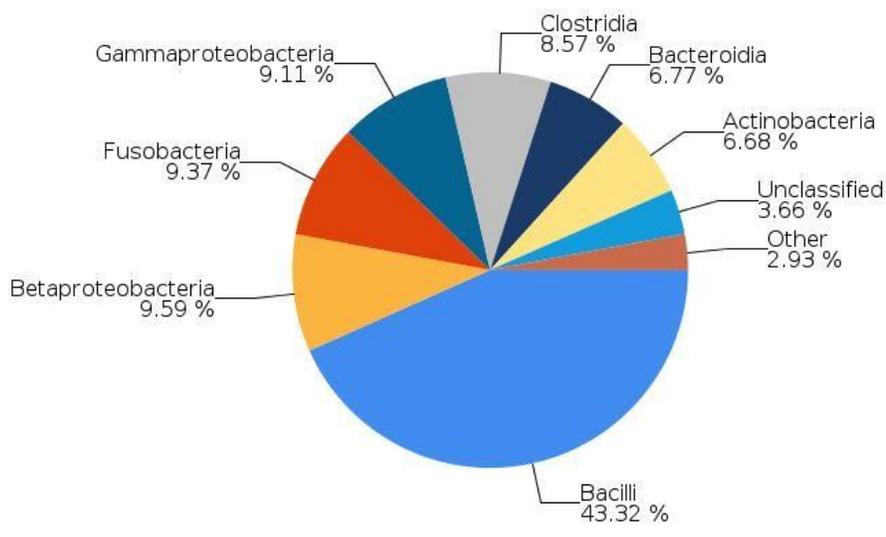
26 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	7,103	43.32 %
Betaproteobacteria	1,572	9.59 %
Fusobacteria	1,536	9.37 %
Gammaproteobacteria	1,493	9.11 %
Clostridia	1,406	8.57 %
Bacteroidia	1,110	6.77 %
Actinobacteria	1,096	6.68 %
Unclassified at Class level	600	3.66 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 27. This table shows the top 8 of 27 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



}

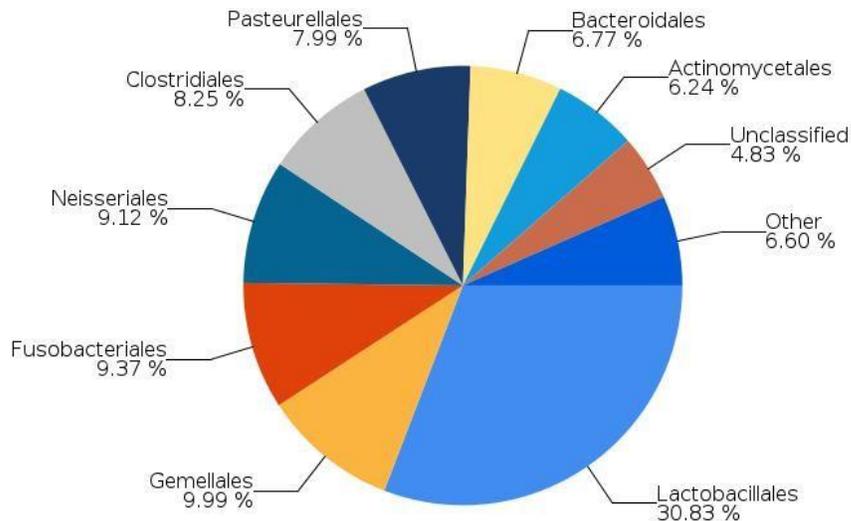
27 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	5,056	30.83 %
Gemellales	1,638	9.99 %
Fusobacteriales	1,536	9.37 %
Neisseriales	1,496	9.12 %
Clostridiales	1,353	8.25 %
Pasteurellales	1,310	7.99 %
Bacteroidales	1,110	6.77 %
Actinomycetales	1,023	6.24 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 64. This table shows the top 8 of 64 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



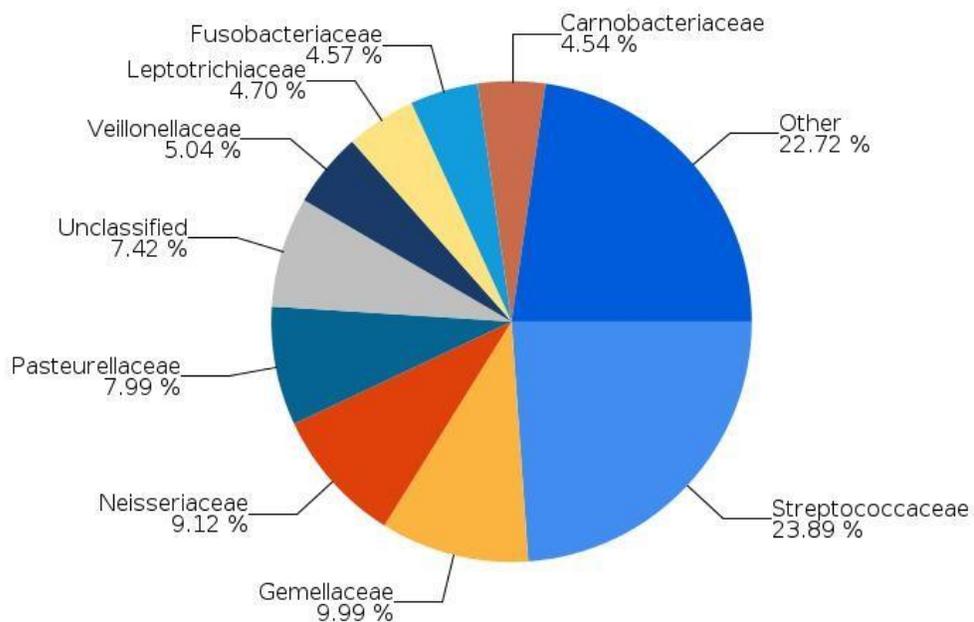
28 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	3,918	23.89 %
Gemellaceae	1,638	9.99 %
Neisseriaceae	1,496	9.12 %
Pasteurellaceae	1,310	7.99 %
Unclassified at Family level	1,217	7.42 %
Veillonellaceae	826	5.04 %
Leptotrichiaceae	771	4.70 %
Fusobacteriaceae	750	4.57 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 131. This table shows the top 8 of 131 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



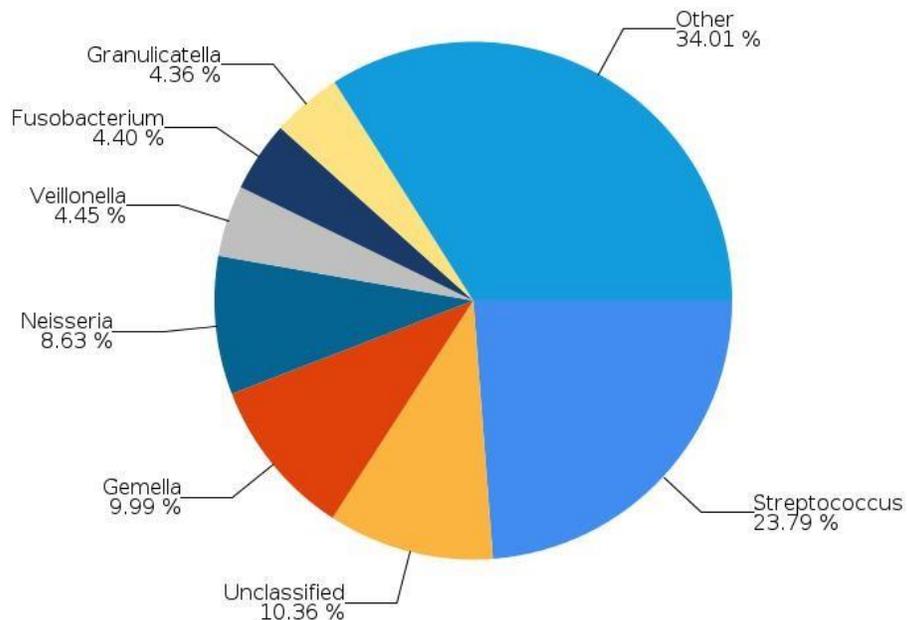
29 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	3,901	23.79 %
Unclassified at Genus level	1,699	10.36 %
Gemella	1,638	9.99 %
Neisseria	1,415	8.63 %
Veillonella	730	4.45 %
Fusobacterium	722	4.40 %
Granulicatella	715	4.36 %
Prevotella	573	3.49 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 249. This table shows the top 8 of 249 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



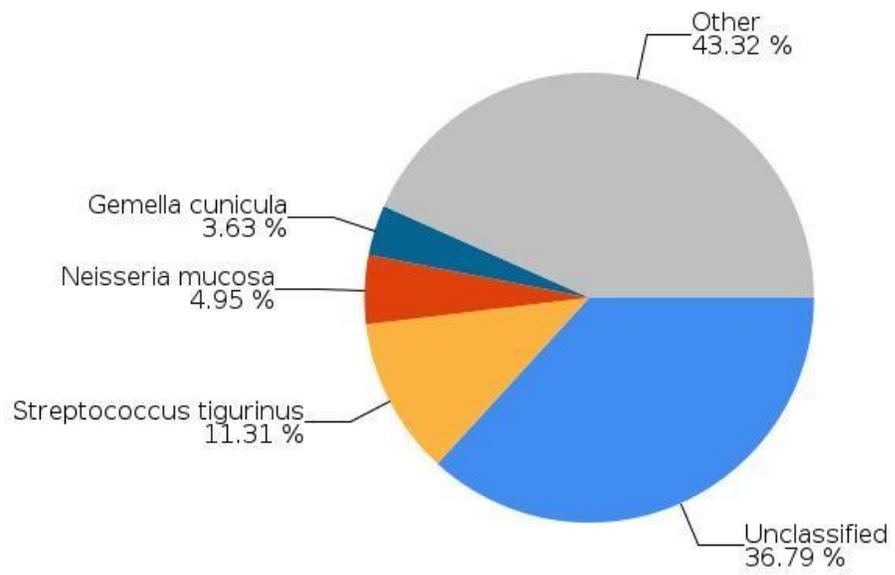
30 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	6,033	36.79 %
Streptococcus tigurinus	1,854	11.31 %
Neisseria mucosa	811	4.95 %
Gemella cunicula	595	3.63 %
Gemella sanguinis	491	2.99 %
Granulicatella elegans	425	2.59 %
Neisseria flavescens	324	1.98 %
Streptococcus oralis	311	1.90 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 335. This table shows the top 8 of 335 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-04

Report Date: 08/31/2018 18:16:54 (UTC)

Sample Configuration

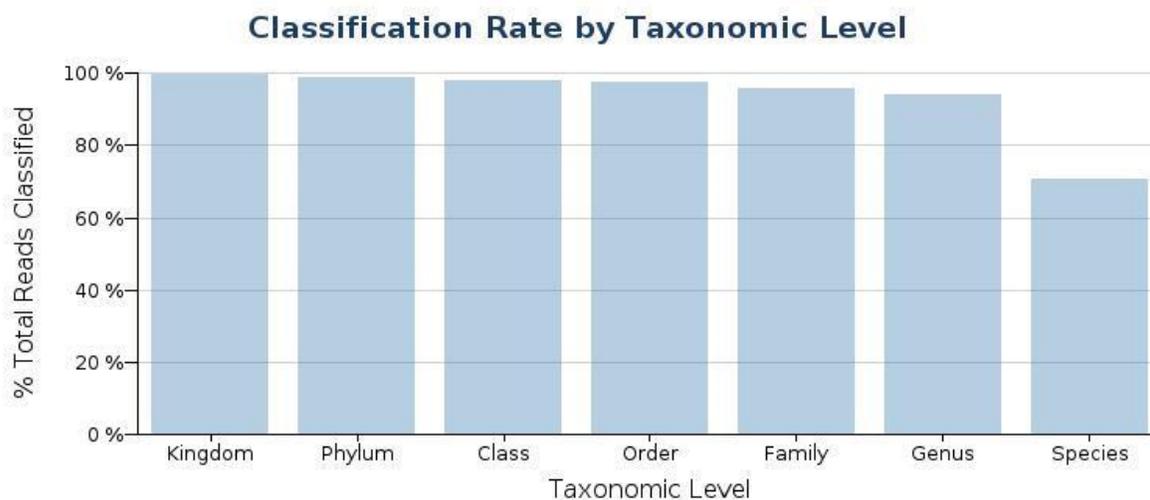
Sample ID:	4
Sample Name:	AI-04
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
218,023	218,023	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	217,048	99.55 %
Phylum	215,211	98.71 %
Class	213,656	98.00 %
Order	212,625	97.52 %
Family	208,560	95.66 %
Genus	204,630	93.86 %
Species	154,304	70.77 %



Classification Results by Taxonomic Level

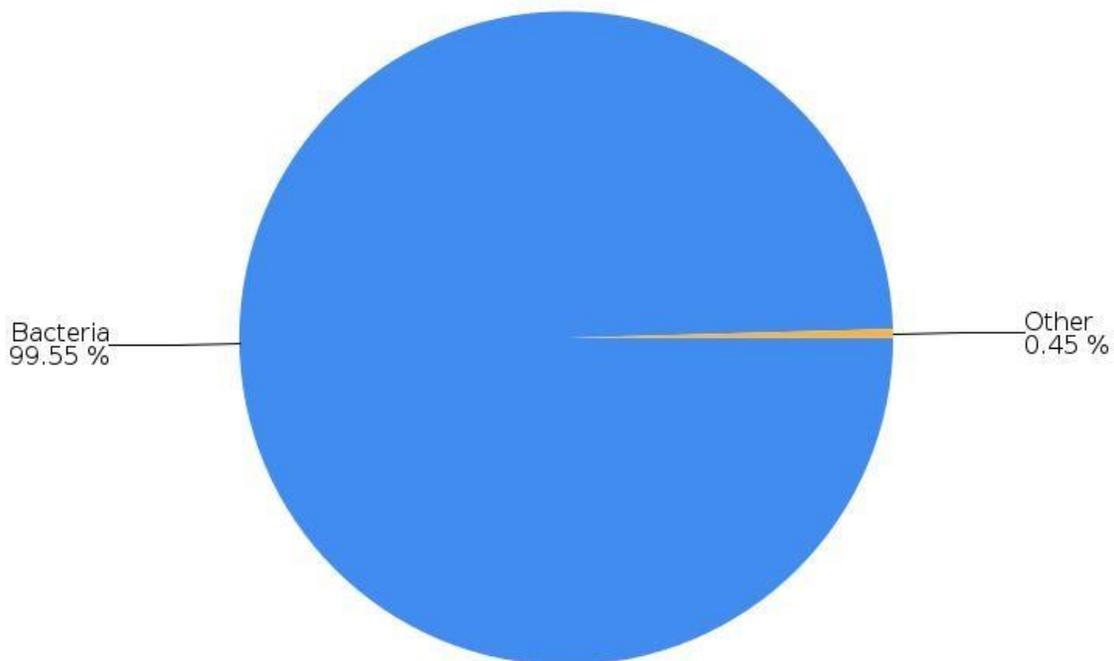
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

31 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	217,046	99.55 %
Unclassified at Kingdom level	975	0.45 %
Viruses	2	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



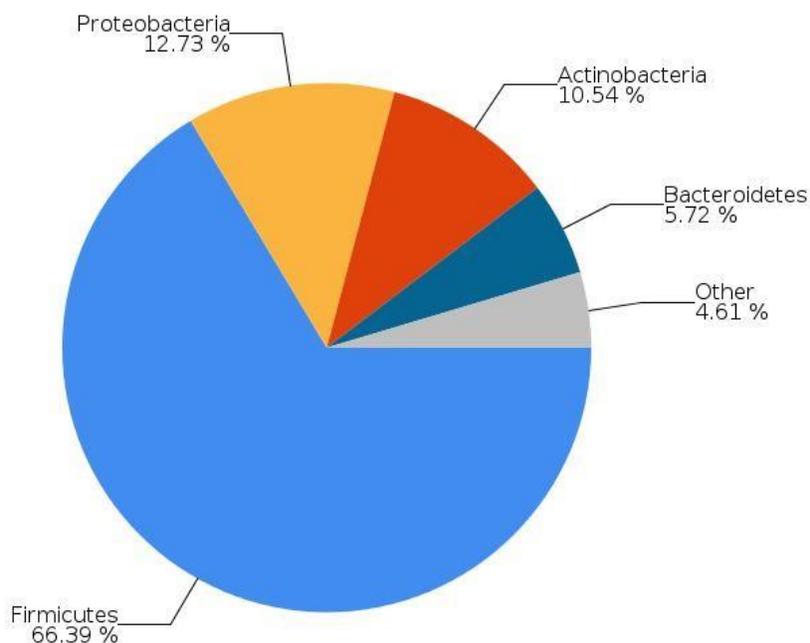
32 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	144,756	66.39 %
Proteobacteria	27,757	12.73 %
Actinobacteria	22,980	10.54 %
Bacteroidetes	12,475	5.72 %
Fusobacteria	6,746	3.09 %
Unclassified at Phylum level	2,812	1.29 %
Chlorobi	152	0.07 %
Cyanobacteria	95	0.04 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 23. This table shows the top 8 of 23 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



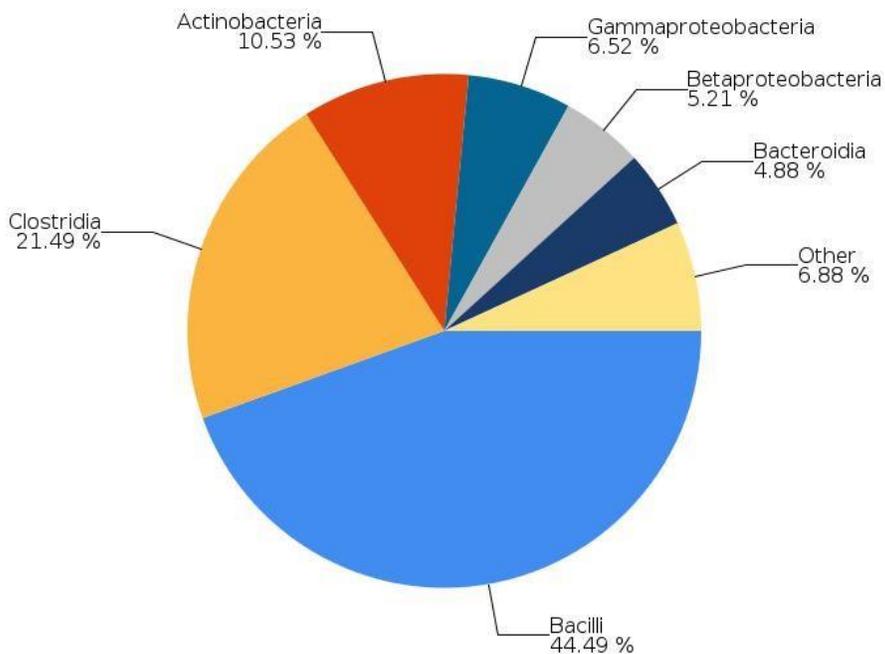
33 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	96,989	44.49 %
Clostridia	46,861	21.49 %
Actinobacteria	22,967	10.53 %
Gammaproteobacteria	14,208	6.52 %
Betaproteobacteria	11,354	5.21 %
Bacteroidia	10,645	4.88 %
Fusobacteria	6,746	3.09 %
Unclassified at Class level	4,367	2.00 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 39. This table shows the top 8 of 39 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



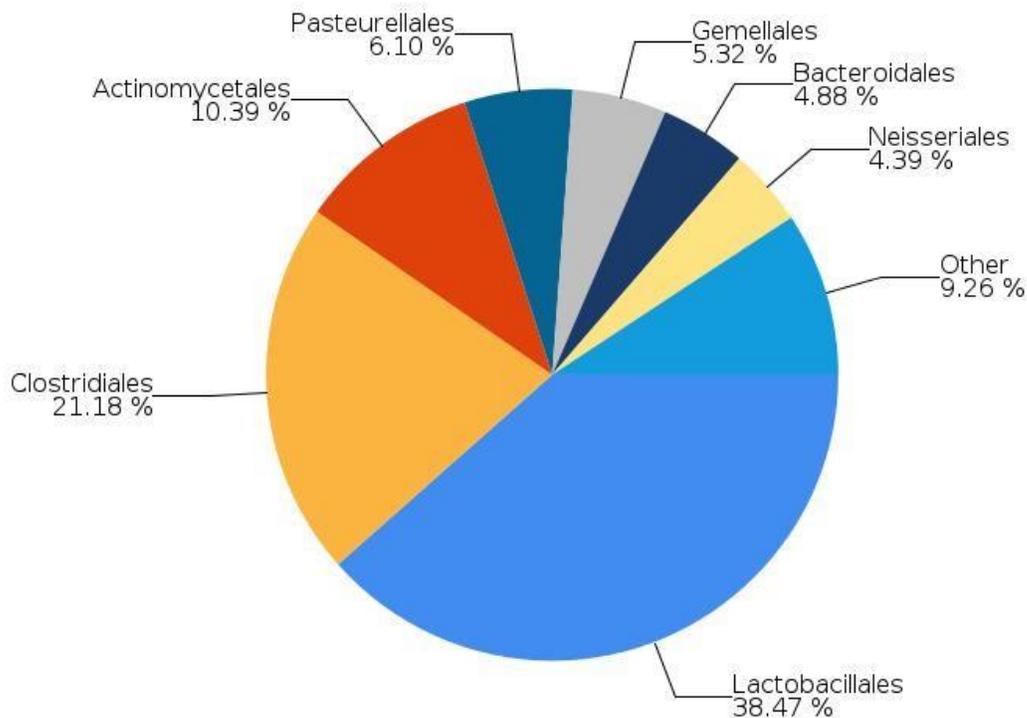
34 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	83,871	38.47 %
Clostridiales	46,185	21.18 %
Actinomycetales	22,655	10.39 %
Pasteurellales	13,307	6.10 %
Gemellales	11,608	5.32 %
Bacteroidales	10,645	4.88 %
Neisseriales	9,565	4.39 %
Fusobacteriales	6,746	3.09 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 82. This table shows the top 8 of 82 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results

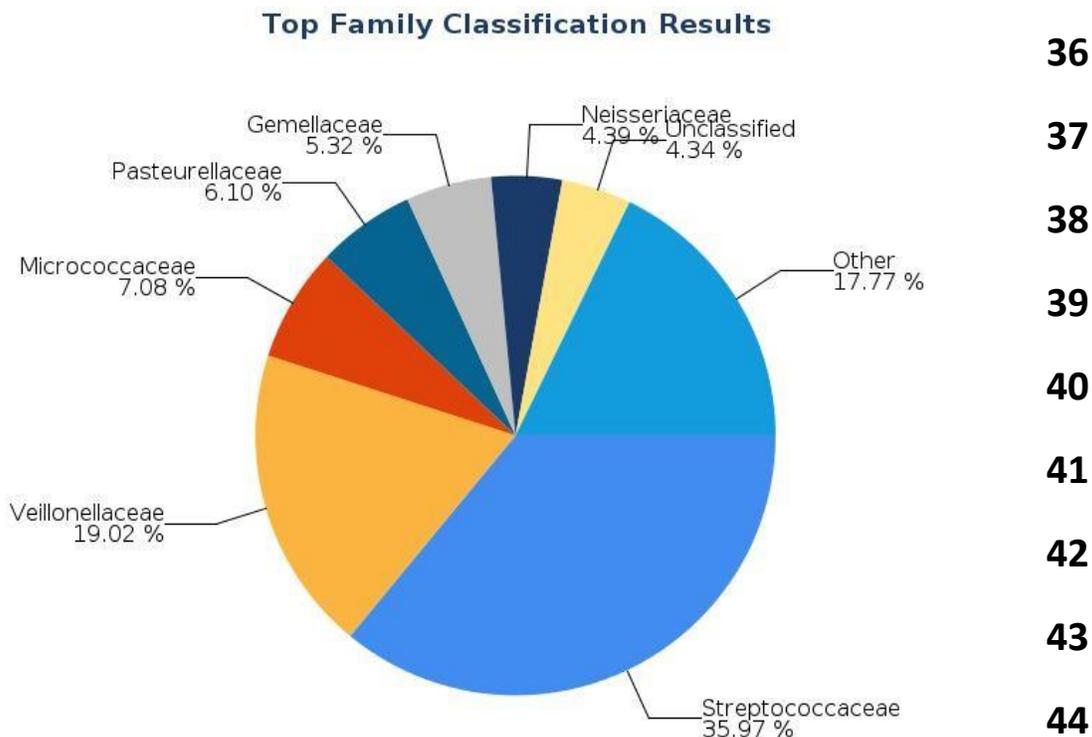


35 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	78,420	35.97 %
Veillonellaceae	41,467	19.02 %
Micrococcaceae	15,446	7.08 %
Pasteurellaceae	13,307	6.10 %
Gemellaceae	11,608	5.32 %
Neisseriaceae	9,565	4.39 %
Unclassified at Family level	9,463	4.34 %
Prevotellaceae	6,361	2.92 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 178. This table shows the top 8 of 178 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.



36
37
38
39
40
41
42
43
44

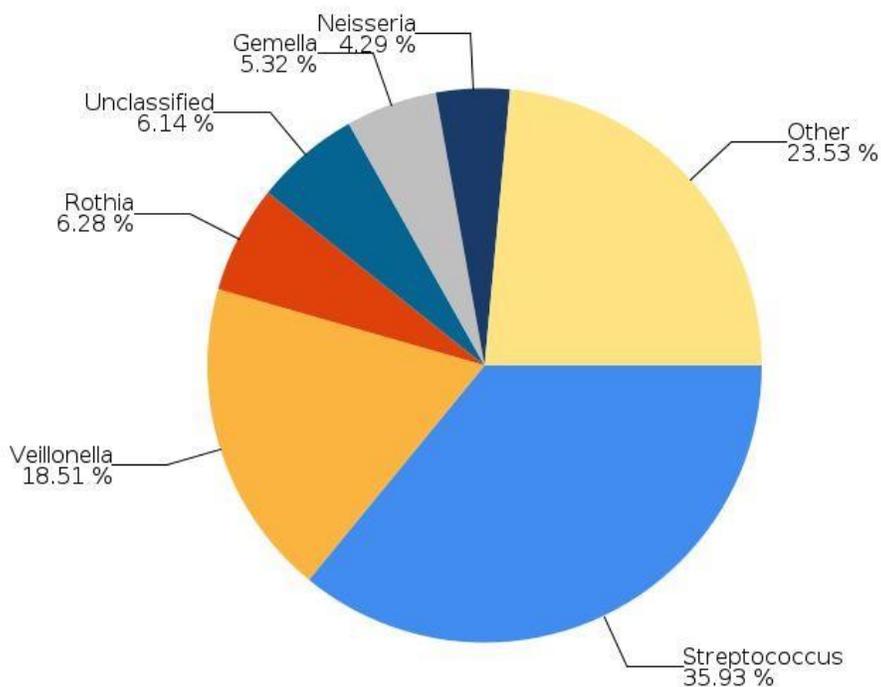
45 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	78,327	35.93 %
Veillonella	40,357	18.51 %
Rothia	13,683	6.28 %
Unclassified at Genus level	13,393	6.14 %
Gemella	11,608	5.32 %
Neisseria	9,346	4.29 %
Prevotella	6,642	3.05 %
Haemophilus	6,075	2.79 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 401. This table shows the top 8 of 401 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



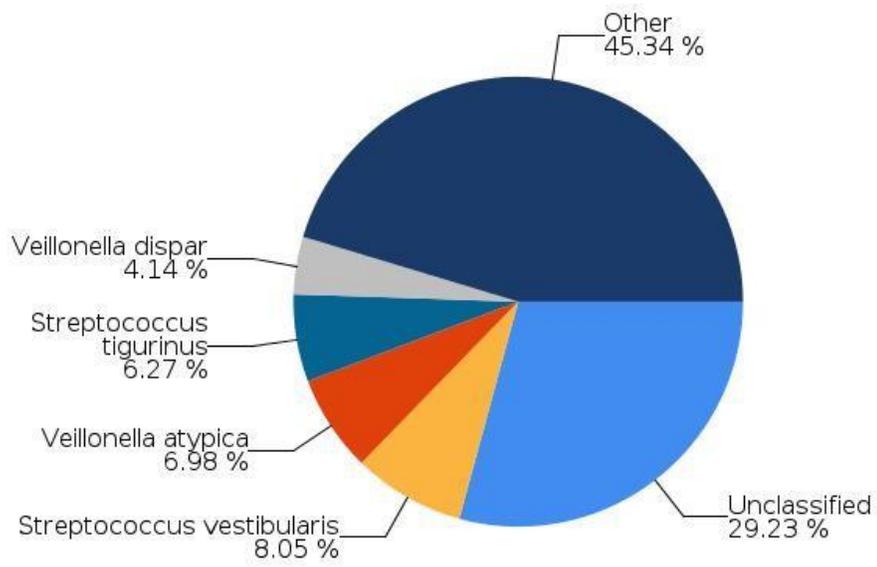
46 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	63,719	29.23 %
Streptococcus vestibularis	17,551	8.05 %
Veillonella atypica	15,218	6.98 %
Streptococcus tigurinus	13,667	6.27 %
Veillonella dispar	9,024	4.14 %
Rothia mucilaginosa	6,806	3.12 %
Veillonella parvula	6,044	2.77 %
Neisseria mucosa	6,041	2.77 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 589. This table shows the top 8 of 589 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-05

Report Date: 08/31/2018 18:17:04 (UTC)

Sample Configuration

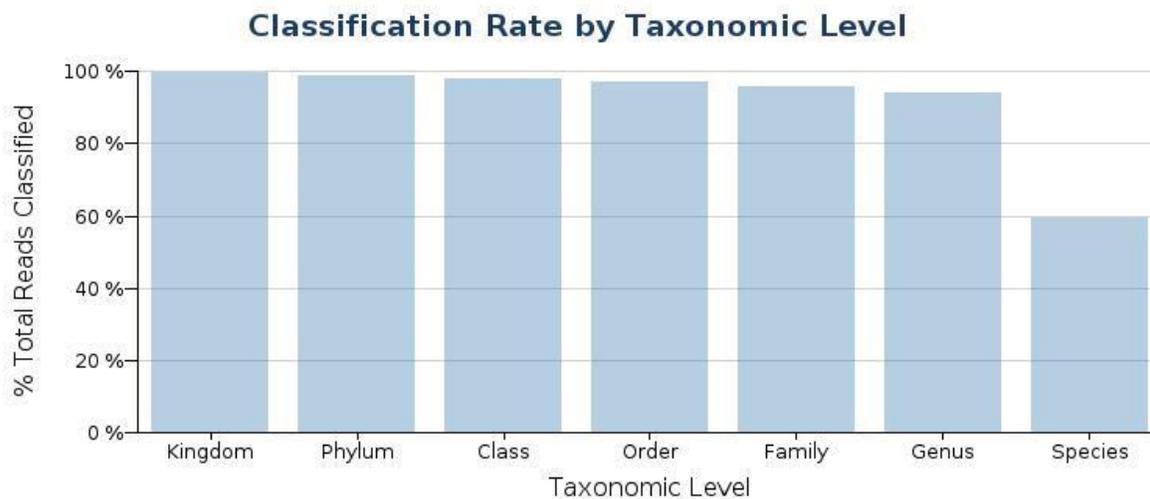
Sample ID:	5
Sample Name:	AI-05
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
278,853	278,853	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	278,531	99.88 %
Phylum	275,209	98.69 %
Class	272,898	97.86 %
Order	271,126	97.23 %
Family	267,223	95.83 %
Genus	261,807	93.89 %
Species	165,649	59.40 %



Classification Results by Taxonomic Level

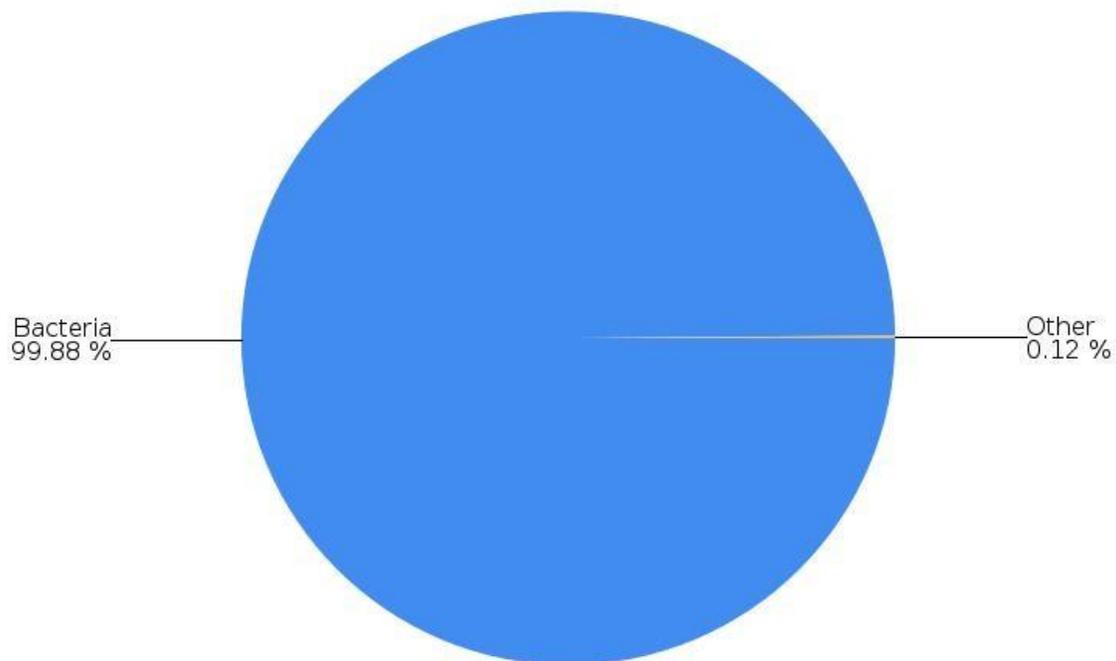
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

47 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	278,529	99.88 %
Unclassified at Kingdom level	322	0.12 %
Viruses	2	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



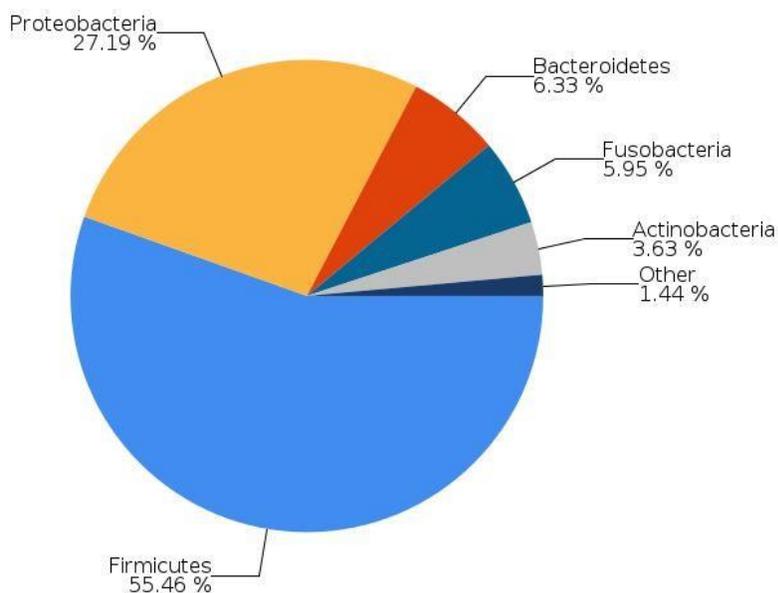
48 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	154,649	55.46 %
Proteobacteria	75,833	27.19 %
Bacteroidetes	17,665	6.33 %
Fusobacteria	16,584	5.95 %
Actinobacteria	10,117	3.63 %
Unclassified at Phylum level	3,644	1.31 %
Spirochaetes	143	0.05 %
Cyanobacteria	71	0.03 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 24. This table shows the top 8 of 24 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



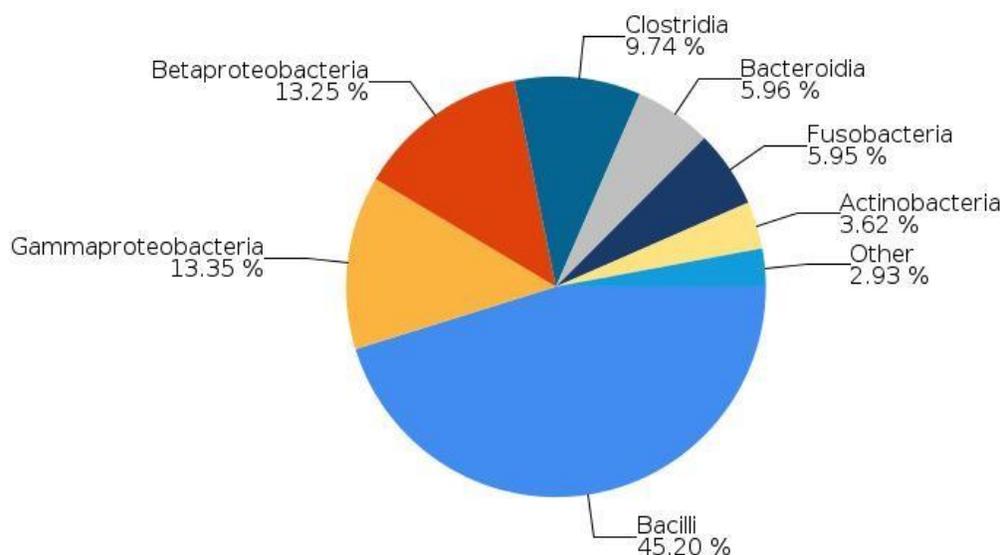
49 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	126,050	45.20 %
Gammaproteobacteria	37,238	13.35 %
Betaproteobacteria	36,940	13.25 %
Clostridia	27,151	9.74 %
Bacteroidia	16,624	5.96 %
Fusobacteria	16,584	5.95 %
Actinobacteria	10,108	3.62 %
Unclassified at Class level	5,955	2.14 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 39. This table shows the top 8 of 39 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



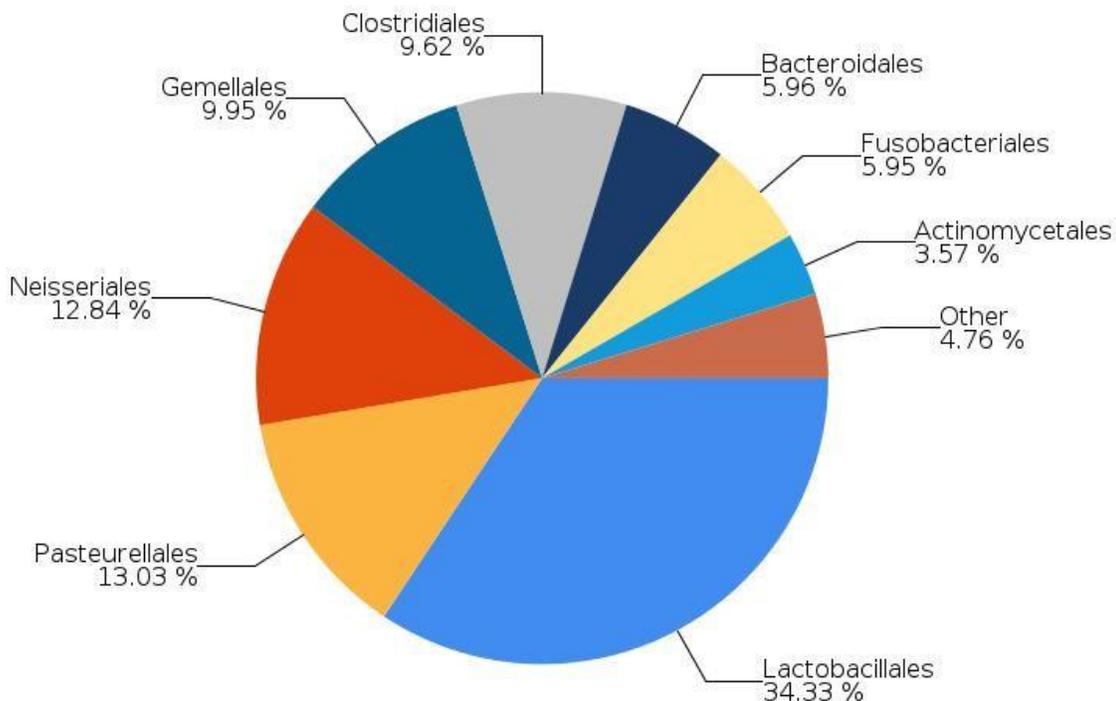
50 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	95,739	34.33 %
Pasteurellales	36,346	13.03 %
Neisseriales	35,798	12.84 %
Gemellales	27,737	9.95 %
Clostridiales	26,815	9.62 %
Bacteroidales	16,624	5.96 %
Fusobacteriales	16,584	5.95 %
Actinomycetales	9,943	3.57 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 80. This table shows the top 8 of 80 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



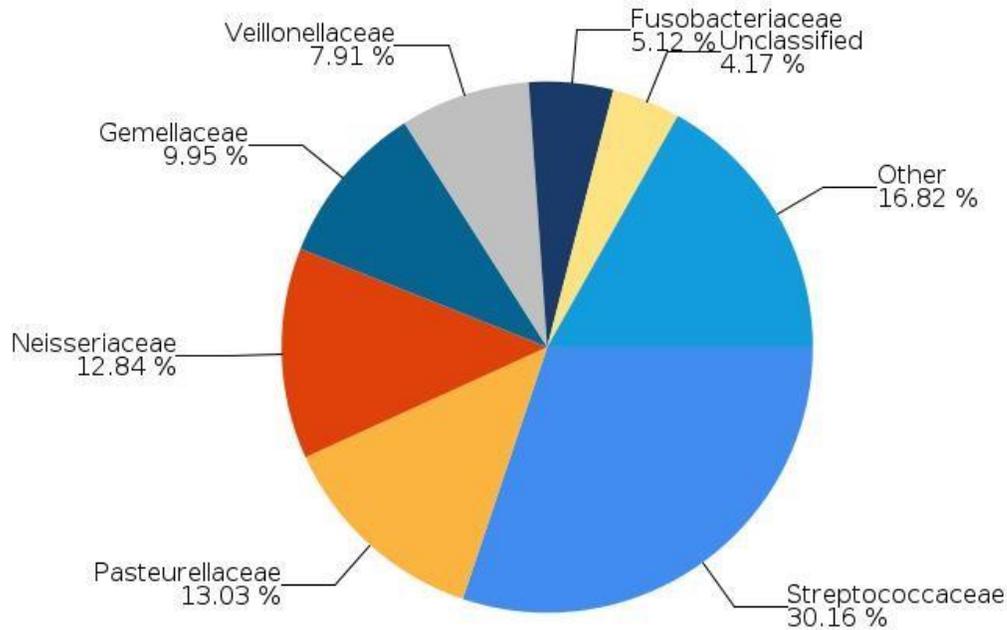
51 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	84,096	30.16 %
Pasteurellaceae	36,346	13.03 %
Neisseriaceae	35,798	12.84 %
Gemellaceae	27,737	9.95 %
Veillonellaceae	22,064	7.91 %
Fusobacteriaceae	14,284	5.12 %
Unclassified at Family level	11,630	4.17 %
Paraprevotellaceae	9,124	3.27 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 174. This table shows the top 8 of 174 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



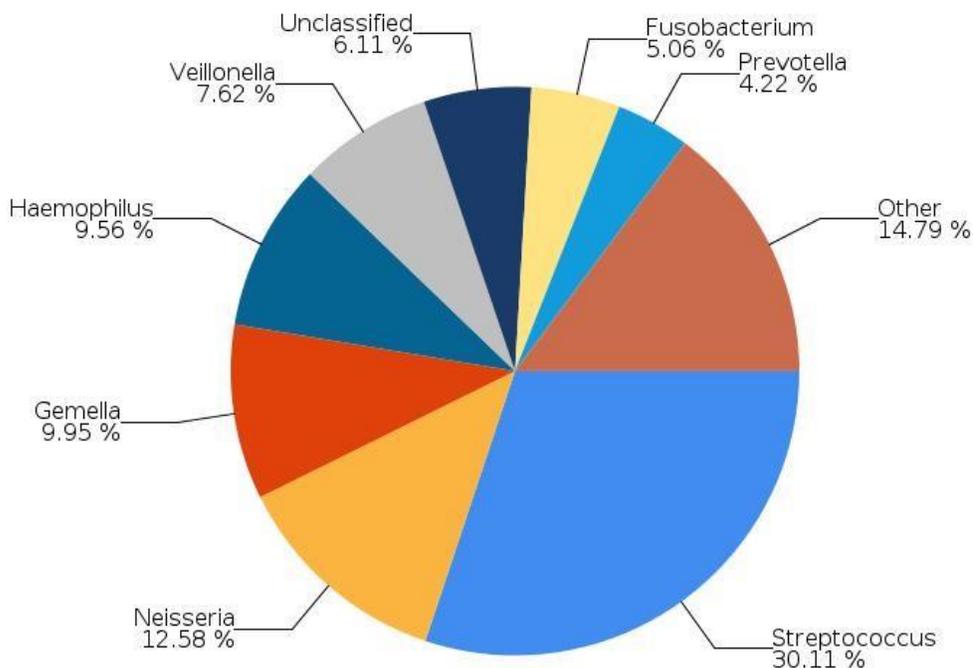
52 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	83,958	30.11 %
Neisseria	35,073	12.58 %
Gemella	27,737	9.95 %
Haemophilus	26,647	9.56 %
Veillonella	21,255	7.62 %
Unclassified at Genus level	17,046	6.11 %
Fusobacterium	14,106	5.06 %
Prevotella	11,778	4.22 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 355. This table shows the top 8 of 355 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



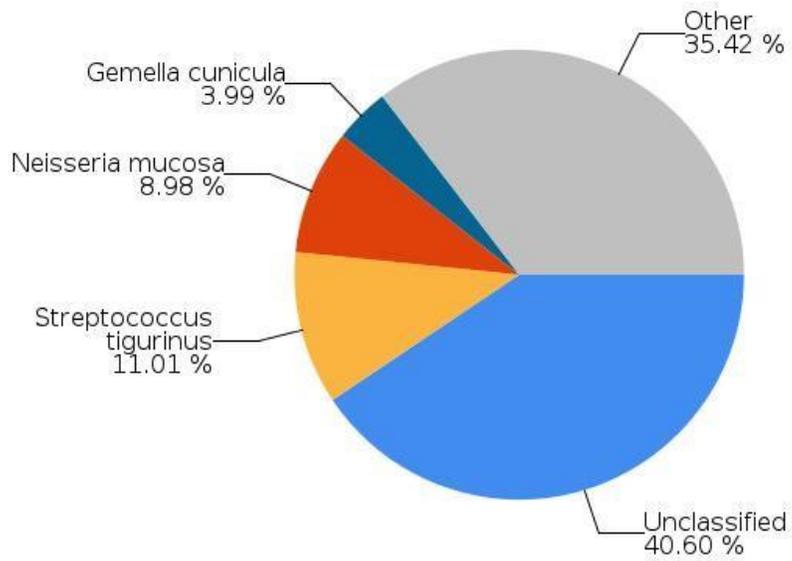
53 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	113,204	40.60 %
Streptococcus tigurinus	30,705	11.01 %
Neisseria mucosa	25,039	8.98 %
Gemella cunicula	11,123	3.99 %
Streptococcus pseudopneumoniae	9,649	3.46 %
Streptococcus infantis	9,606	3.44 %
Streptococcus oralis	7,105	2.55 %
Gemella sanguinis	5,995	2.15 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 522. This table shows the top 8 of 522 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-06

Report Date: 08/31/2018 18:16:58 (UTC)

Sample Configuration

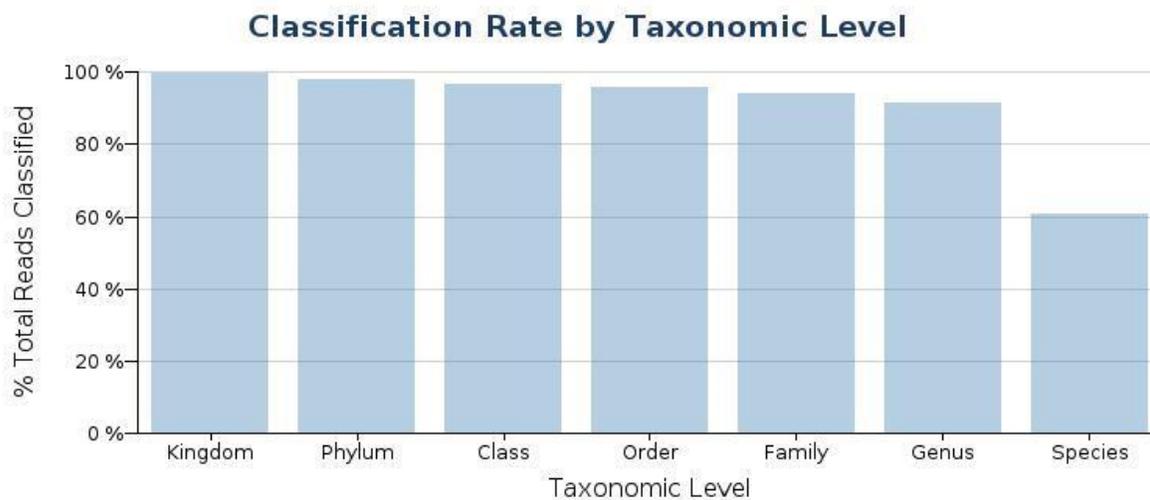
Sample ID:	6
Sample Name:	AI-06
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
68,738	68,738	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	68,518	99.68 %
Phylum	67,400	98.05 %
Class	66,568	96.84 %
Order	65,876	95.84 %
Family	64,666	94.08 %
Genus	62,966	91.60 %
Species	41,891	60.94 %



Classification Results by Taxonomic Level

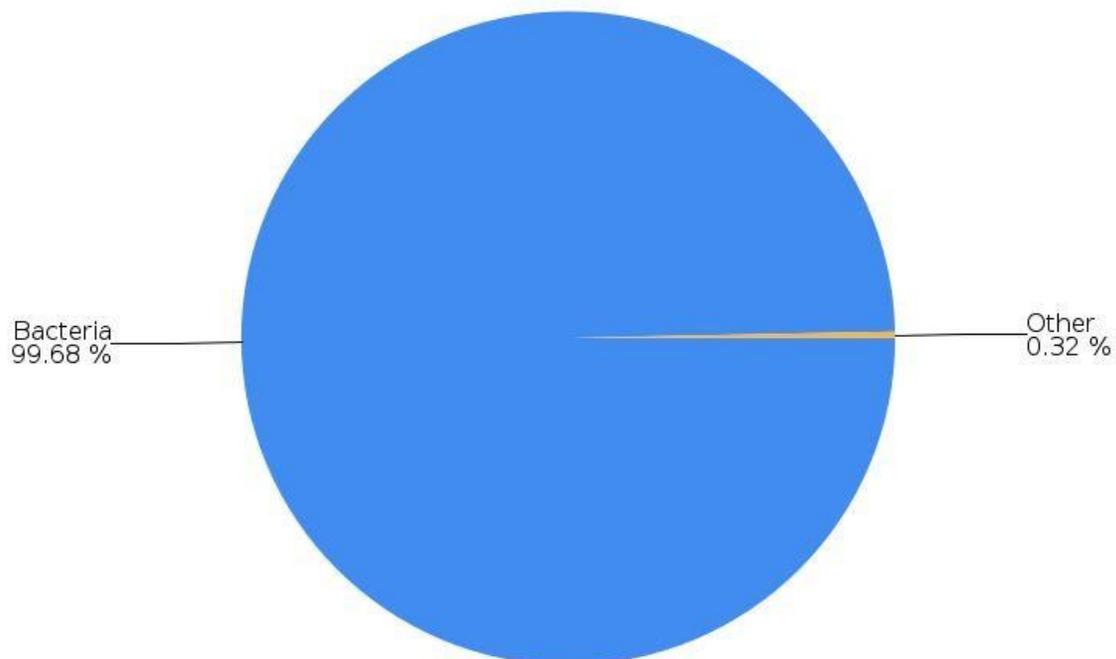
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

54 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	68,517	99.68 %
Unclassified at Kingdom level	220	0.32 %
Viruses	1	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



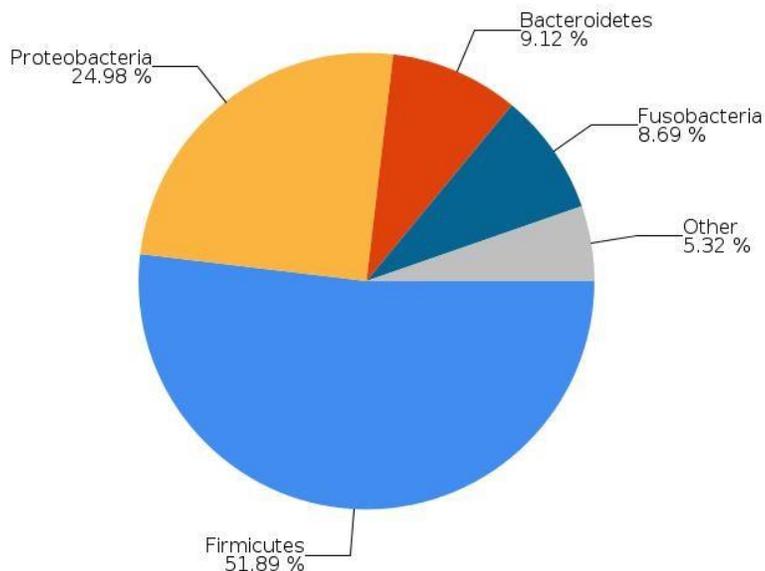
55 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	35,668	51.89 %
Proteobacteria	17,174	24.98 %
Bacteroidetes	6,272	9.12 %
Fusobacteria	5,970	8.69 %
Actinobacteria	2,188	3.18 %
Unclassified at Phylum level	1,338	1.95 %
Thermi	21	0.03 %
Verrucomicrobia	20	0.03 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 22. This table shows the top 8 of 22 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



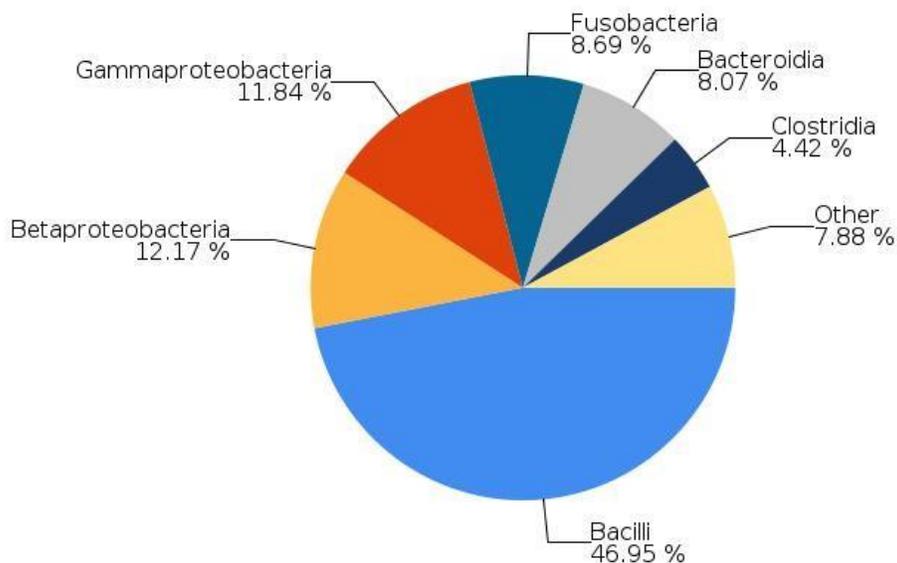
56 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	32,270	46.95 %
Betaproteobacteria	8,363	12.17 %
Gammaproteobacteria	8,136	11.84 %
Fusobacteria	5,970	8.69 %
Bacteroidia	5,545	8.07 %
Clostridia	3,038	4.42 %
Actinobacteria	2,176	3.17 %
Unclassified at Class level	2,170	3.16 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 40. This table shows the top 8 of 40 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



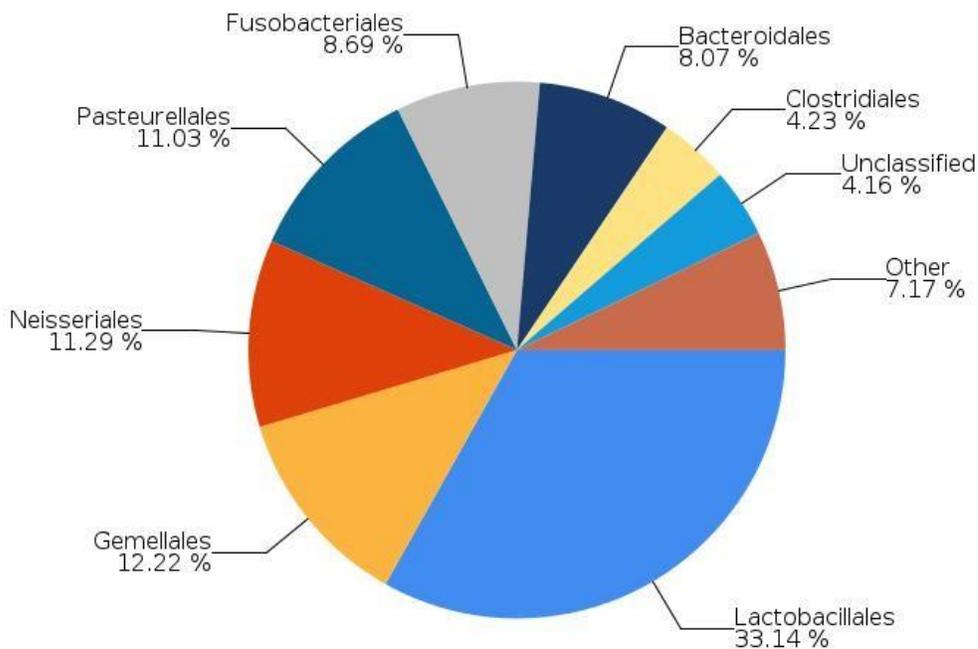
57 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	22,782	33.14 %
Gemellales	8,402	12.22 %
Neisseriales	7,760	11.29 %
Pasteurellales	7,580	11.03 %
Fusobacteriales	5,970	8.69 %
Bacteroidales	5,545	8.07 %
Clostridiales	2,907	4.23 %
Unclassified at Order level	2,862	4.16 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 80. This table shows the top 8 of 80 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



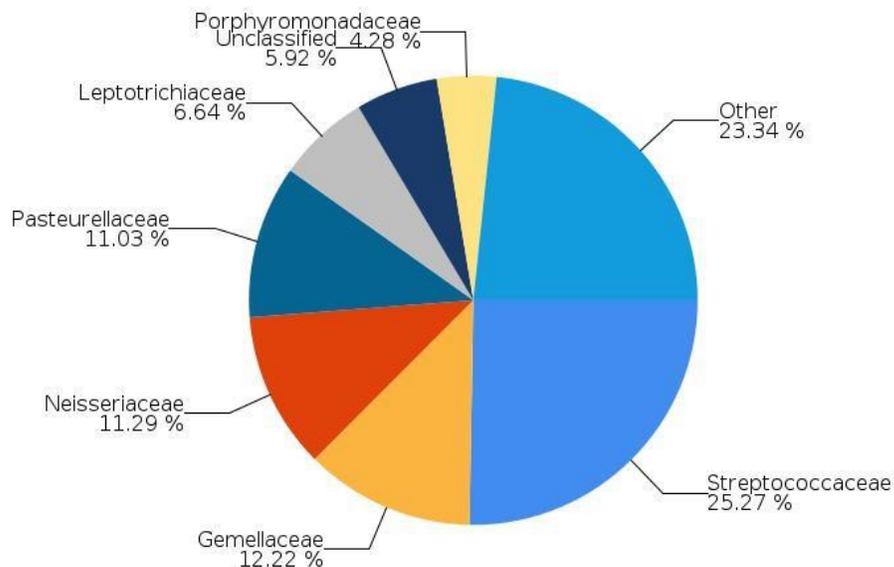
58 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	17,373	25.27 %
Gemellaceae	8,402	12.22 %
Neisseriaceae	7,760	11.29 %
Pasteurellaceae	7,580	11.03 %
Leptotrichiaceae	4,567	6.64 %
Unclassified at Family level	4,072	5.92 %
Porphyromonadaceae	2,943	4.28 %
Carnobacteriaceae	2,391	3.48 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 167. This table shows the top 8 of 167 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



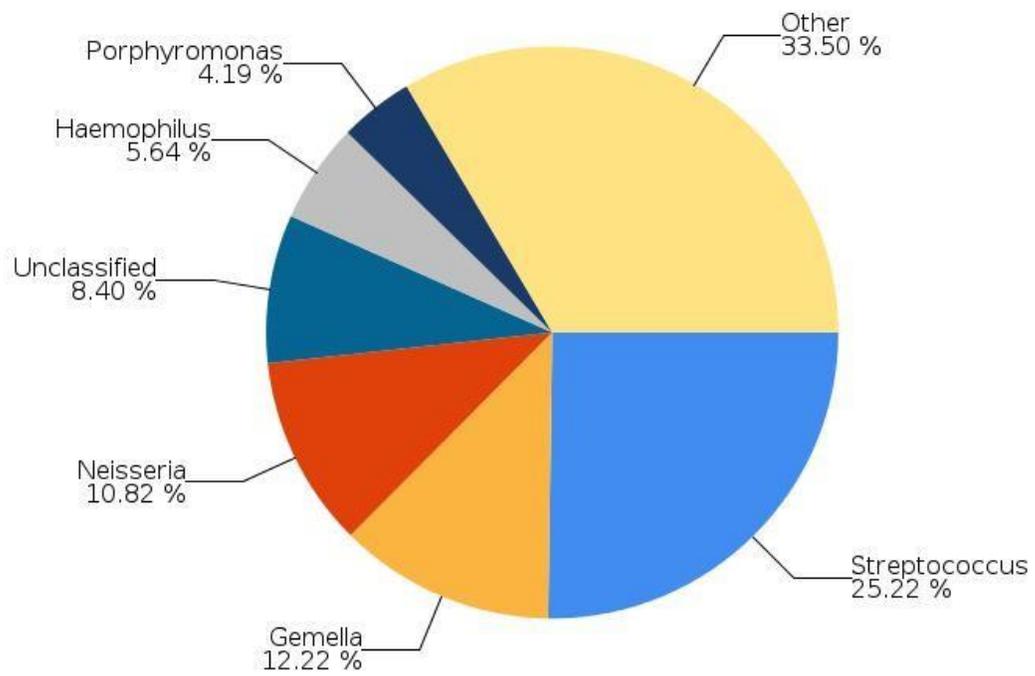
59 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	17,339	25.22 %
Gemella	8,402	12.22 %
Neisseria	7,440	10.82 %
Unclassified at Genus level	5,772	8.40 %
Haemophilus	3,878	5.64 %
Porphyromonas	2,881	4.19 %
Granulicatella	2,295	3.34 %
Veillonella	2,073	3.02 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 306. This table shows the top 8 of 306 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



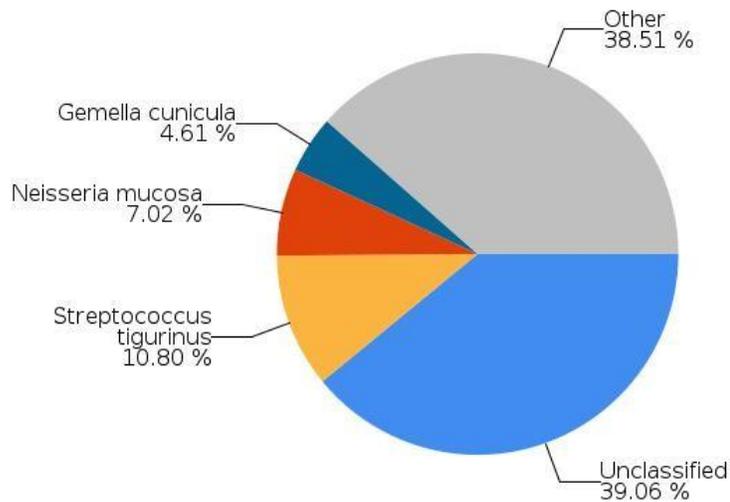
60 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	26,847	39.06 %
<i>Streptococcus tigurinus</i>	7,427	10.80 %
<i>Neisseria mucosa</i>	4,827	7.02 %
<i>Gemella cunicula</i>	3,169	4.61 %
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1,891	2.75 %
<i>Gemella sanguinis</i>	1,787	2.60 %
<i>Mannheimia caviae</i>	1,703	2.48 %
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,657	2.41 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 406. This table shows the top 8 of 406 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results



illumina[®]

16S Metagenomics Report

Sample: AI-07

Report Date: 08/31/2018 18:17:02 (UTC)

Sample Configuration

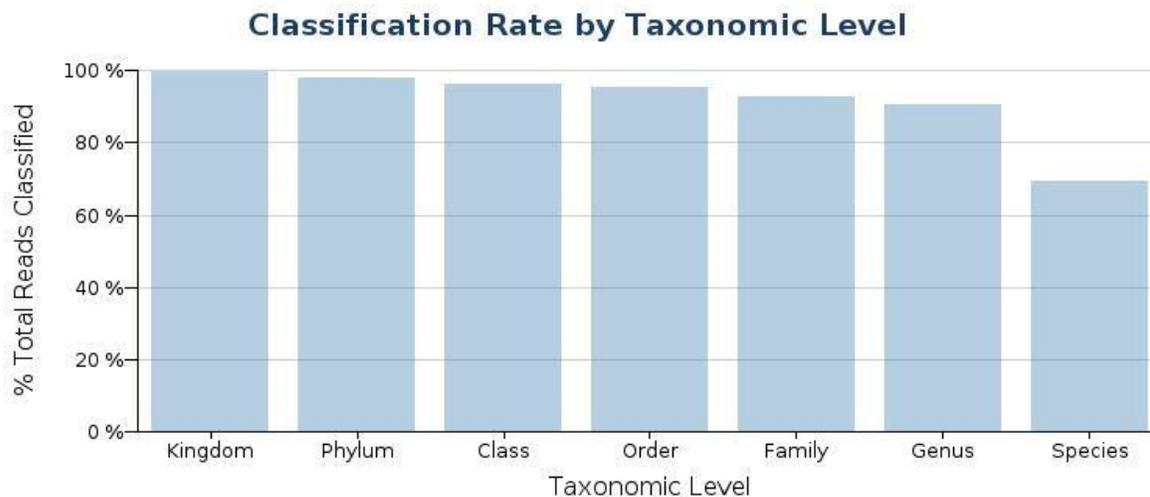
Sample ID:	7
Sample Name:	AI-07
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
92,108	92,108	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	91,889	99.76 %
Phylum	90,250	97.98 %
Class	88,811	96.42 %
Order	87,966	95.50 %
Family	85,289	92.60 %
Genus	83,450	90.60 %
Species	63,777	69.24 %



Classification Results by Taxonomic Level

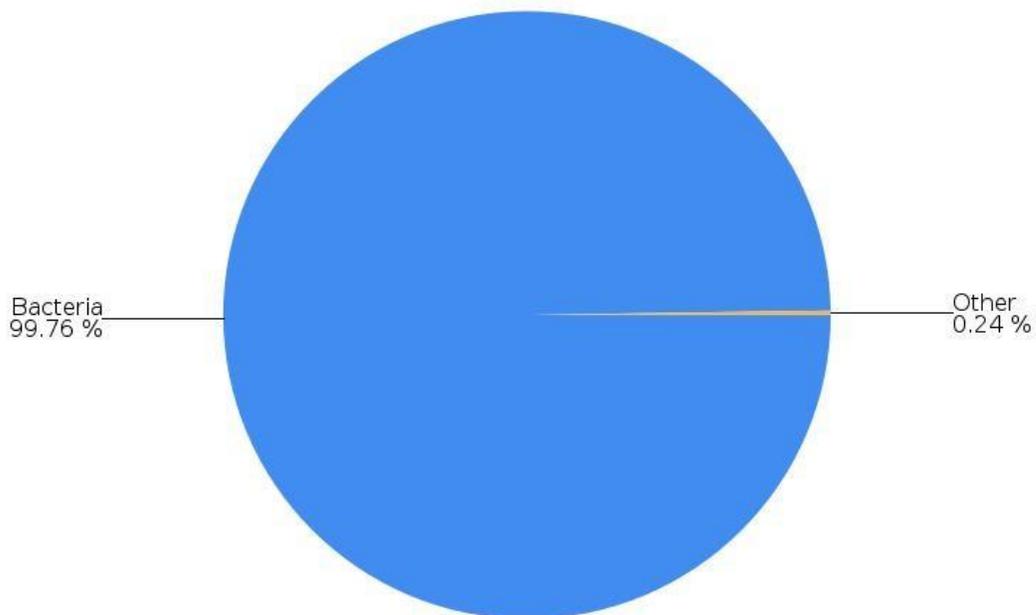
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

61 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	91,889	99.76 %
Unclassified at Kingdom level	219	0.24 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



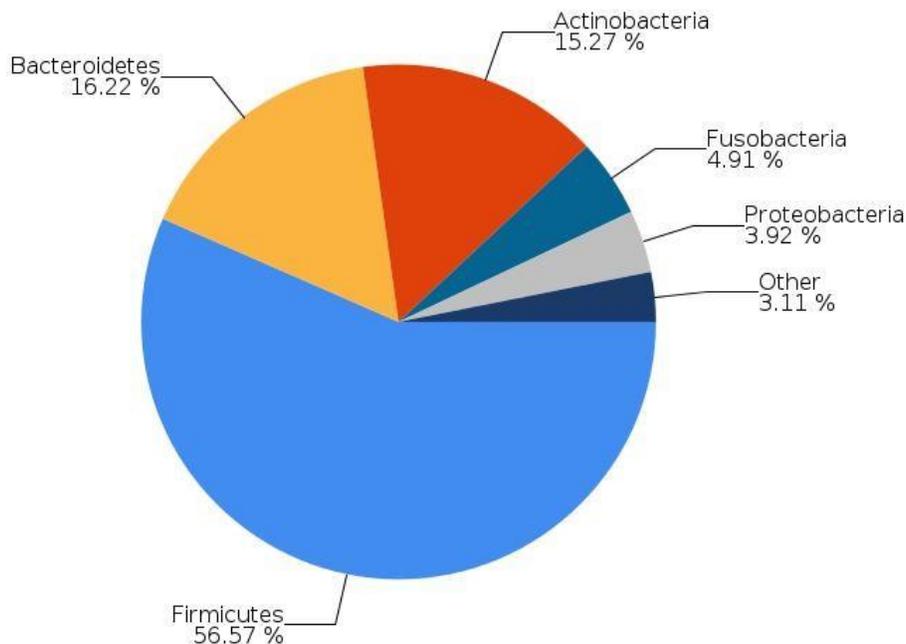
62 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	52,101	56.57 %
Bacteroidetes	14,937	16.22 %
Actinobacteria	14,069	15.27 %
Fusobacteria	4,520	4.91 %
Proteobacteria	3,612	3.92 %
Unclassified at Phylum level	1,858	2.02 %
Spirochaetes	546	0.59 %
Cyanobacteria	139	0.15 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 21. This table shows the top 8 of 21 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



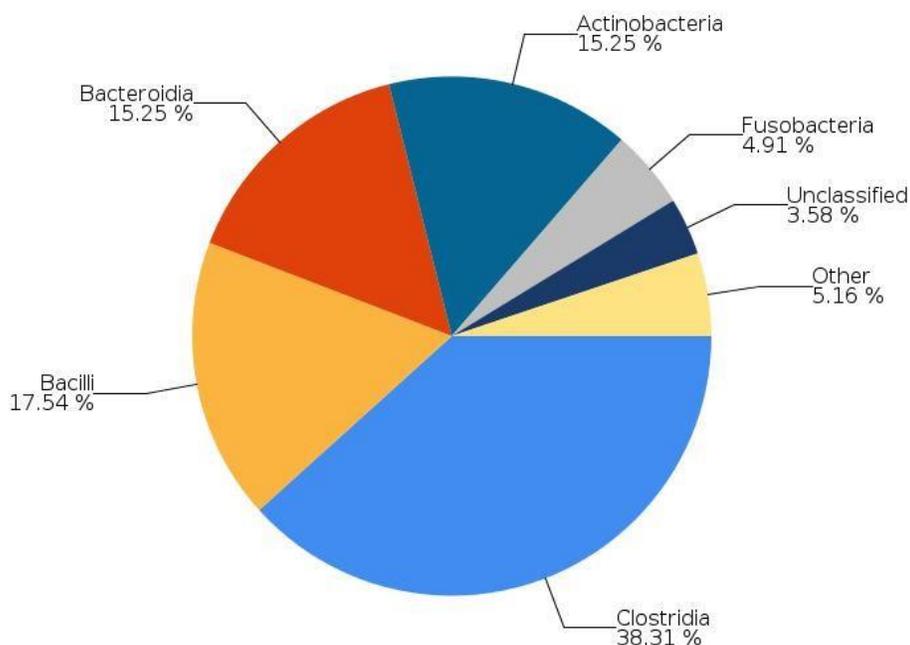
63 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridia	35,289	38.31 %
Bacilli	16,155	17.54 %
Bacteroidia	14,049	15.25 %
Actinobacteria	14,045	15.25 %
Fusobacteria	4,520	4.91 %
Unclassified at Class level	3,297	3.58 %
Epsilonproteobacteria	1,171	1.27 %
Gammaproteobacteria	1,063	1.15 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 35. This table shows the top 8 of 35 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



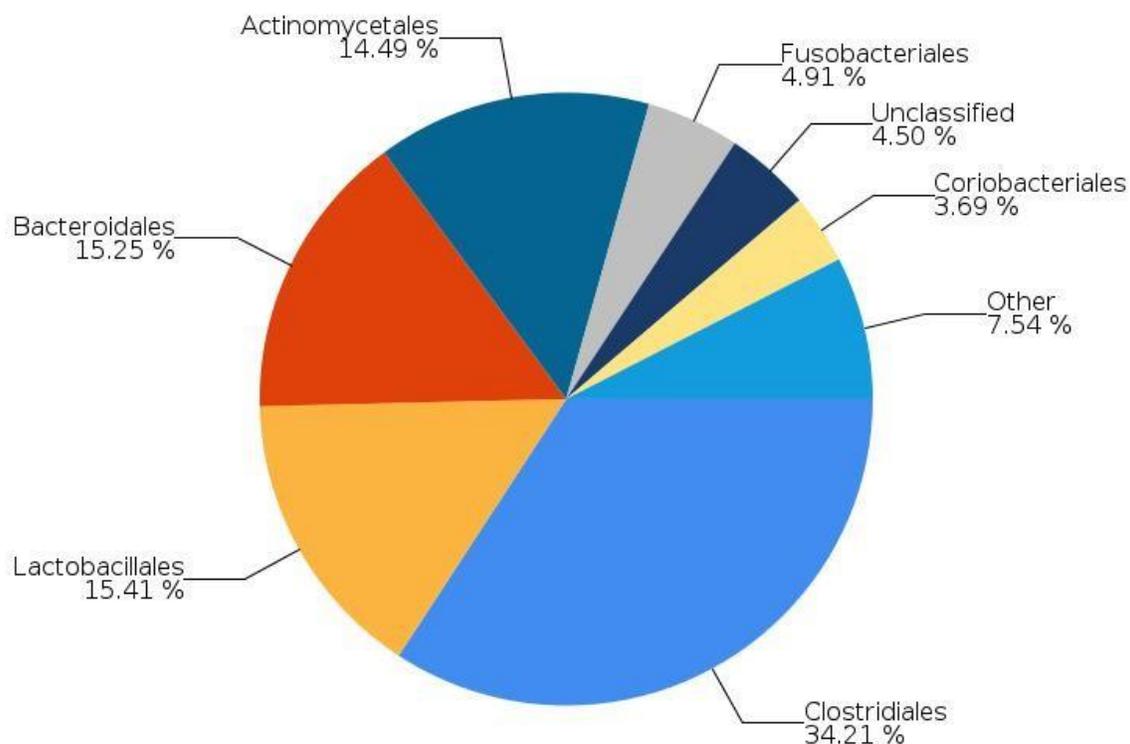
64 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridiales	31,508	34.21 %
Lactobacillales	14,198	15.41 %
Bacteroidales	14,049	15.25 %
Actinomycetales	13,346	14.49 %
Fusobacteriales	4,520	4.91 %
Unclassified at Order level	4,142	4.50 %
Coriobacteriales	3,401	3.69 %
Campylobacteriales	1,171	1.27 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 78. This table shows the top 8 of 78 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results

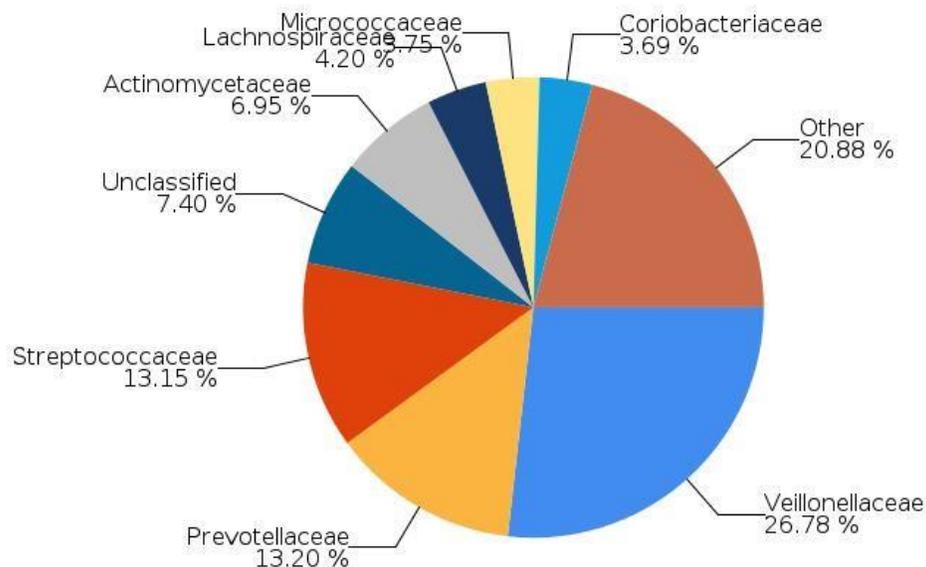


65 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonellaceae	24,663	26.78 %
Prevotellaceae	12,157	13.20 %
Streptococcaceae	12,110	13.15 %
Unclassified at Family level	6,819	7.40 %
Actinomycetaceae	6,404	6.95 %
Lachnospiraceae	3,865	4.20 %
Micrococcaceae	3,453	3.75 %
Coriobacteriaceae	3,401	3.69 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 166. This table shows the top 8 of 166 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



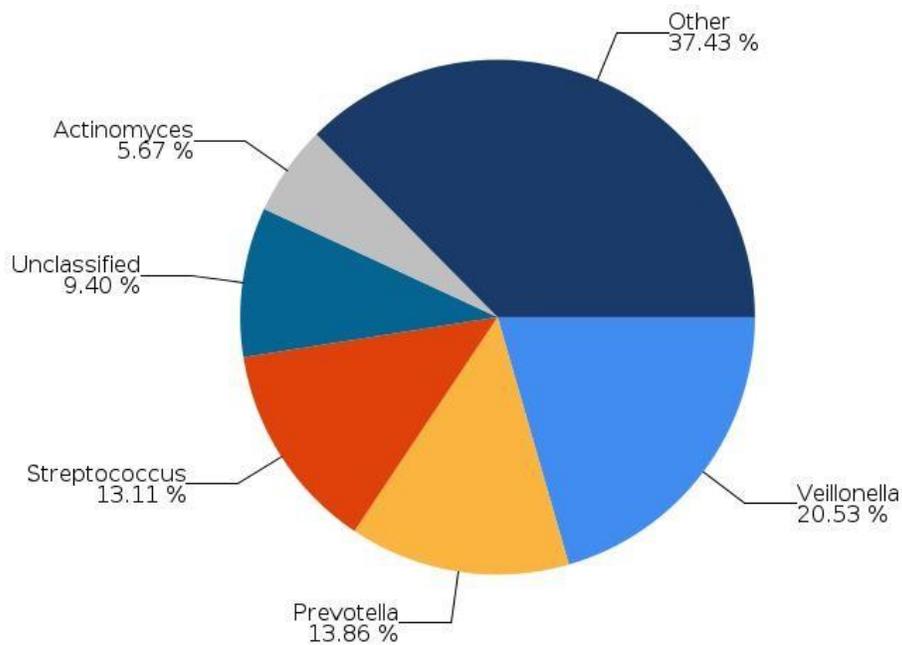
66 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonella	18,913	20.53 %
Prevotella	12,770	13.86 %
Streptococcus	12,074	13.11 %
Unclassified at Genus level	8,658	9.40 %
Actinomyces	5,220	5.67 %
Megasphaera	3,216	3.49 %
Rothia	2,799	3.04 %
Fusobacterium	2,777	3.01 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 341. This table shows the top 8 of 341 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



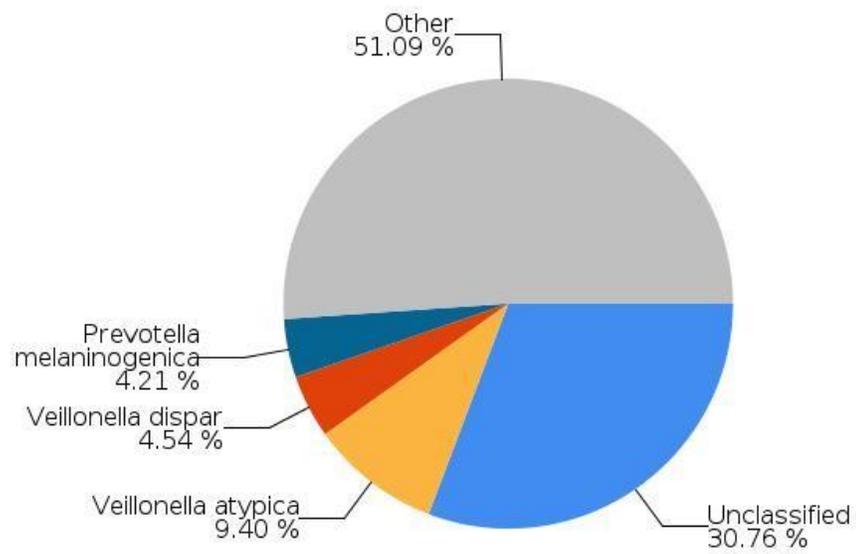
67 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	28,331	30.76 %
Veillonella atypica	8,661	9.40 %
Veillonella dispar	4,184	4.54 %
Prevotella melaninogenica	3,876	4.21 %
Megasphaera micronuciformis	2,569	2.79 %
Streptococcus vestibularis	2,373	2.58 %
Prevotella histicola	2,357	2.56 %
Veillonella montpellierensis	2,207	2.40 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 503. This table shows the top 8 of 503 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-08

Report Date: 08/31/2018 18:16:48 (UTC)

Sample Configuration

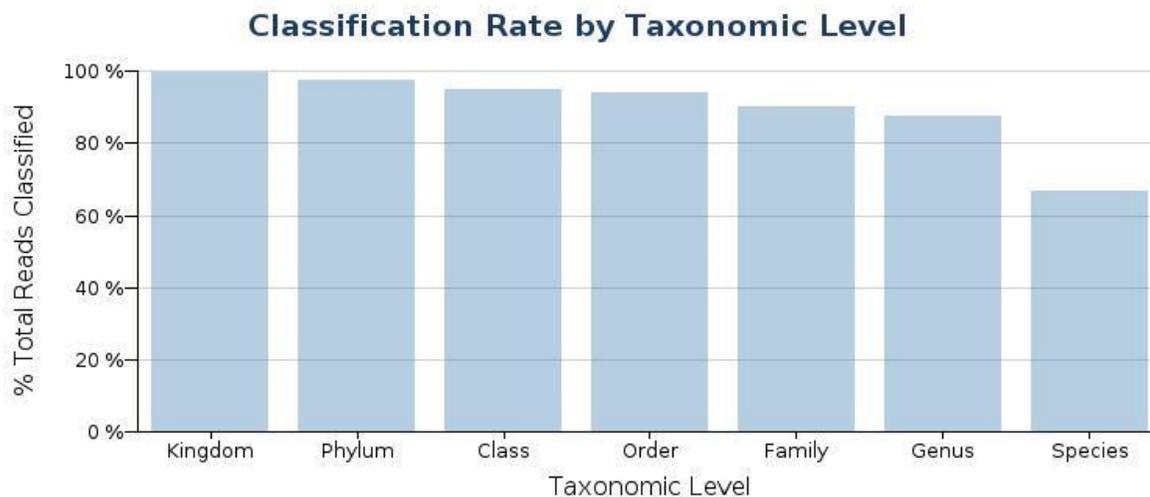
Sample ID:	8
Sample Name:	AI-08
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
66,397	66,397	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	66,177	99.67 %
Phylum	64,640	97.35 %
Class	63,084	95.01 %
Order	62,341	93.89 %
Family	59,824	90.10 %
Genus	58,115	87.53 %
Species	44,488	67.00 %



Classification Results by Taxonomic Level

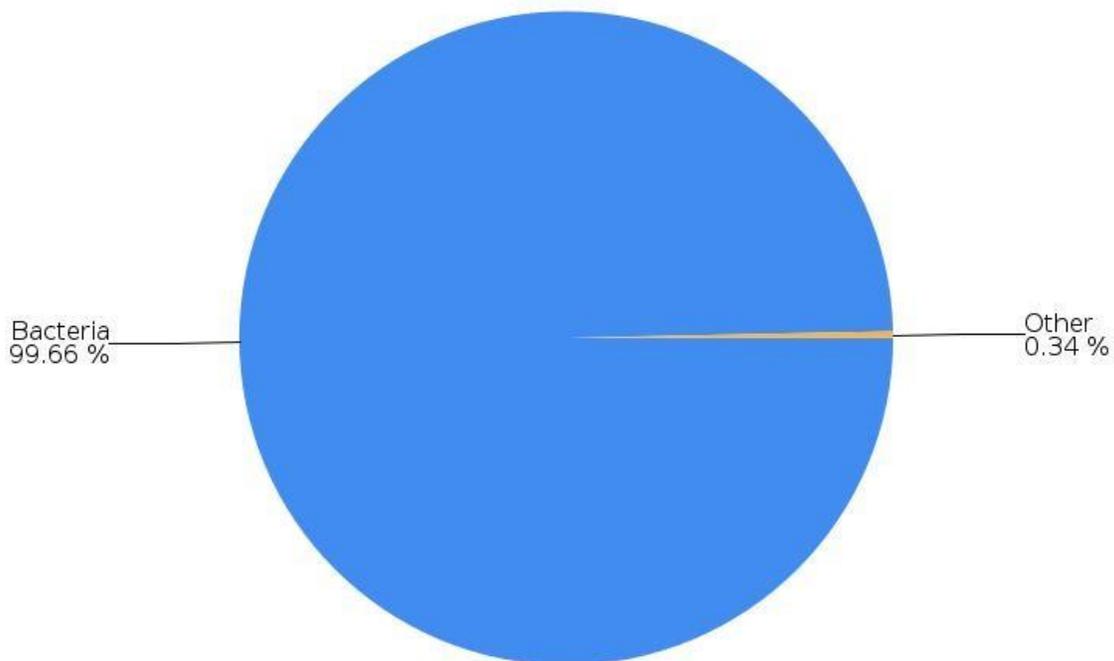
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

68 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	66,173	99.66 %
Unclassified at Kingdom level	220	0.33 %
Viruses	4	0.01 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



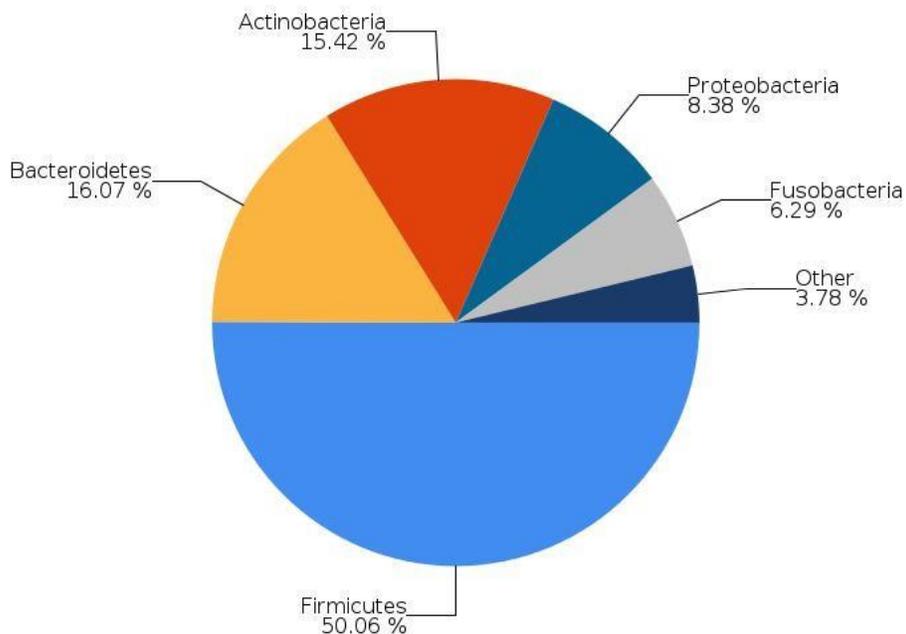
69 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	33,239	50.06 %
Bacteroidetes	10,672	16.07 %
Actinobacteria	10,240	15.42 %
Proteobacteria	5,563	8.38 %
Fusobacteria	4,175	6.29 %
Unclassified at Phylum level	1,757	2.65 %
Spirochaetes	407	0.61 %
Cyanobacteria	111	0.17 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 22. This table shows the top 8 of 22 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



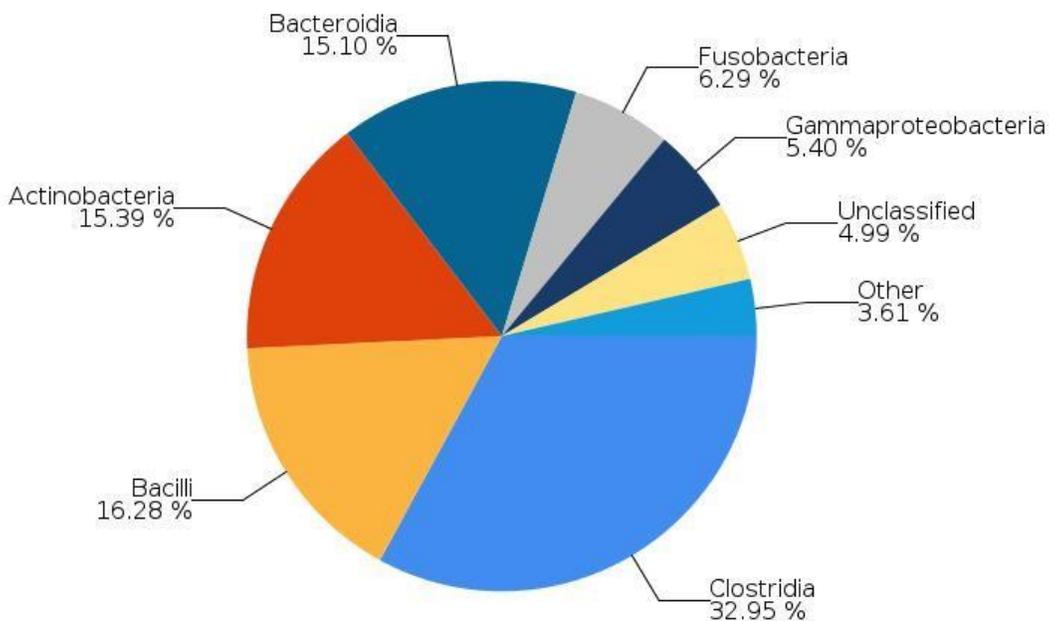
70 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridia	21,877	32.95 %
Bacilli	10,812	16.28 %
Actinobacteria	10,216	15.39 %
Bacteroidia	10,024	15.10 %
Fusobacteria	4,175	6.29 %
Gammaproteobacteria	3,586	5.40 %
Unclassified at Class level	3,313	4.99 %
Betaproteobacteria	821	1.24 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 37. This table shows the top 8 of 37 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



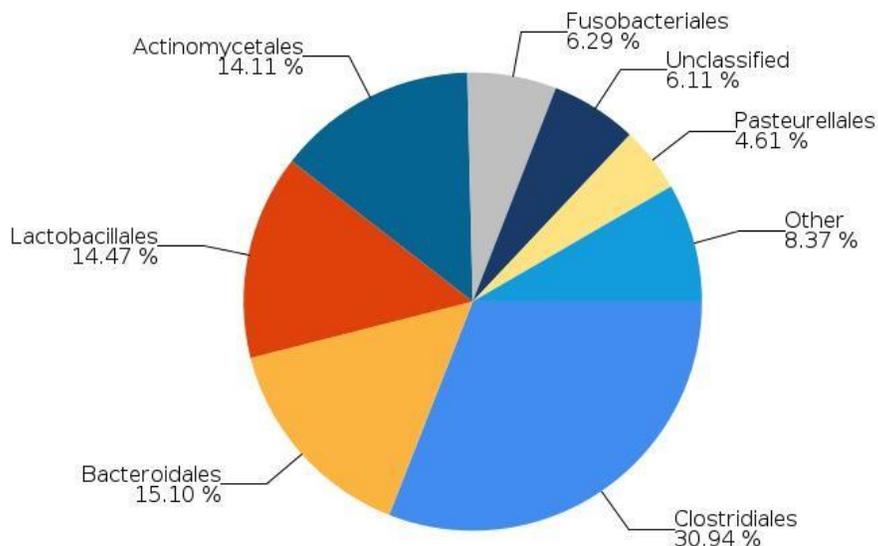
71 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridiales	20,545	30.94 %
Bacteroidales	10,024	15.10 %
Lactobacillales	9,610	14.47 %
Actinomycetales	9,368	14.11 %
Fusobacteriales	4,175	6.29 %
Unclassified at Order level	4,056	6.11 %
Pasteurellales	3,060	4.61 %
Coriobacteriales	976	1.47 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 77. This table shows the top 8 of 77 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



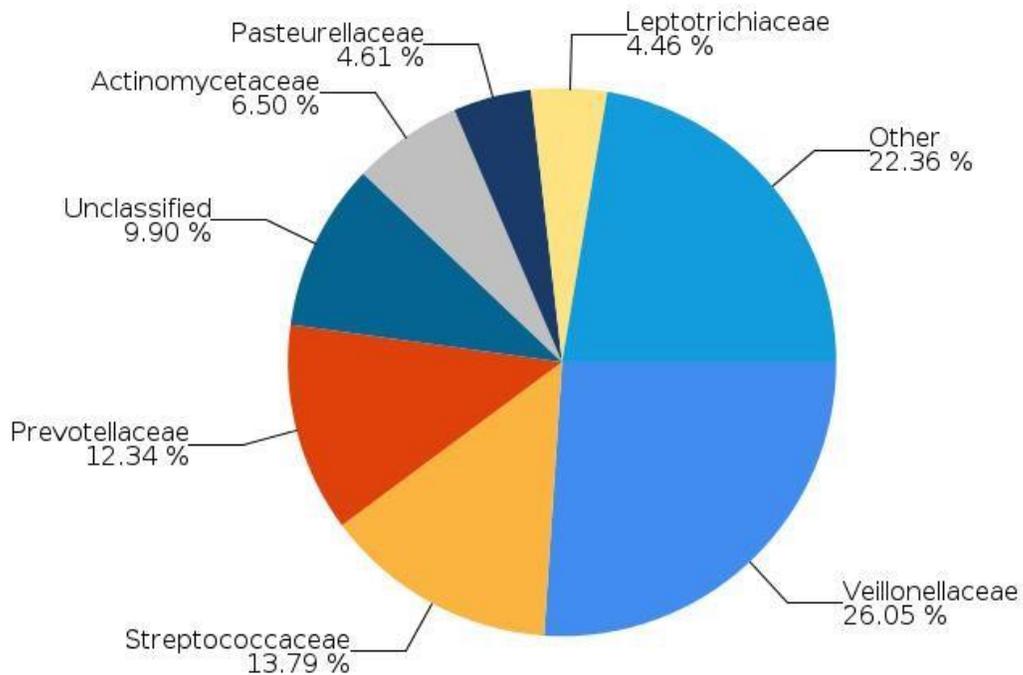
72 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonellaceae	17,295	26.05 %
Streptococcaceae	9,158	13.79 %
Prevotellaceae	8,192	12.34 %
Unclassified at Family level	6,573	9.90 %
Actinomycetaceae	4,313	6.50 %
Pasteurellaceae	3,060	4.61 %
Leptotrichiaceae	2,961	4.46 %
Micrococcaceae	1,435	2.16 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 164. This table shows the top 8 of 164 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



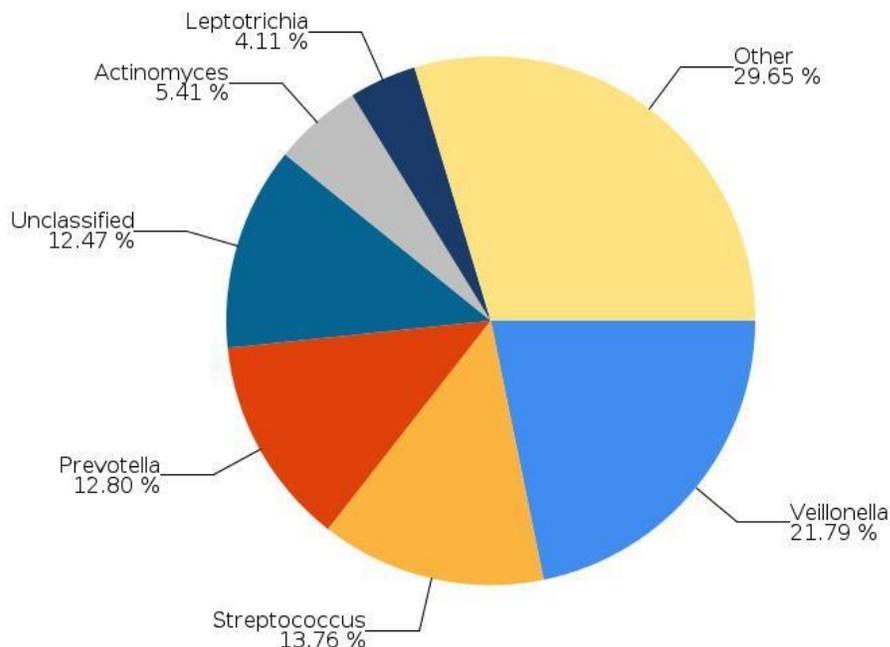
73 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonella	14,470	21.79 %
Streptococcus	9,136	13.76 %
Prevotella	8,499	12.80 %
Unclassified at Genus level	8,282	12.47 %
Actinomyces	3,593	5.41 %
Leptotrichia	2,728	4.11 %
Selenomonas	1,208	1.82 %
Rothia	1,129	1.70 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 325. This table shows the top 8 of 325 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



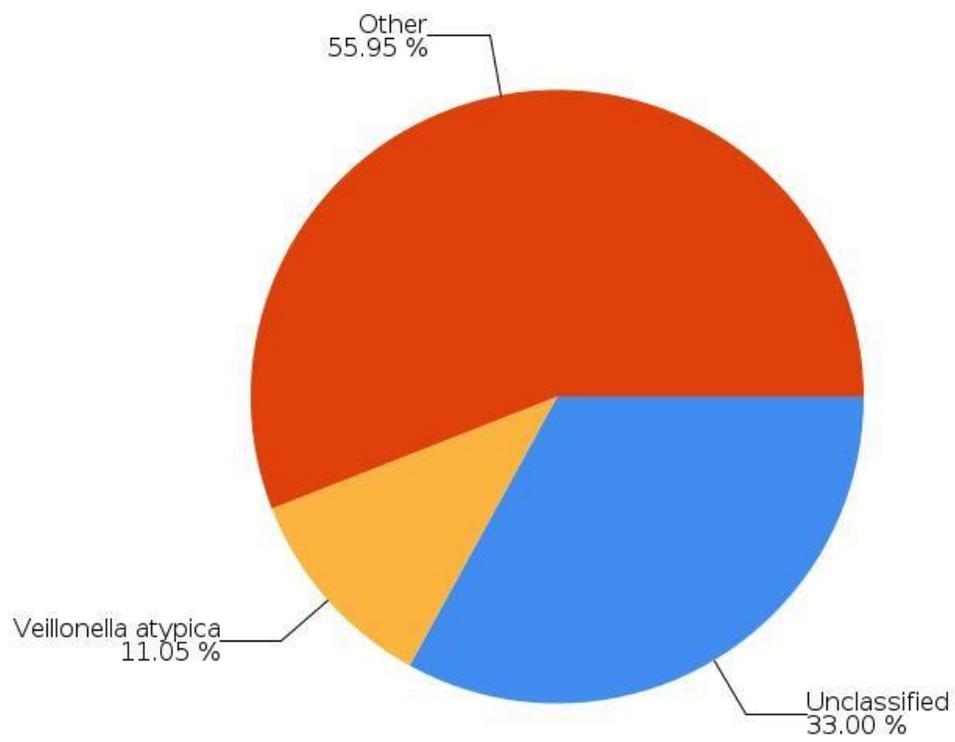
74 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	21,909	33.00 %
Veillonella atypica	7,340	11.05 %
Veillonella montpellierensis	2,113	3.18 %
Streptococcus vestibularis	1,983	2.99 %
Prevotella melaninogenica	1,882	2.83 %
Veillonella dispar	1,786	2.69 %
Prevotella histicola	1,410	2.12 %
Leptotrichia wadei	1,402	2.11 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 470. This table shows the top 8 of 470 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-09

Report Date: 08/31/2018 18:17:01 (UTC)

Sample Configuration

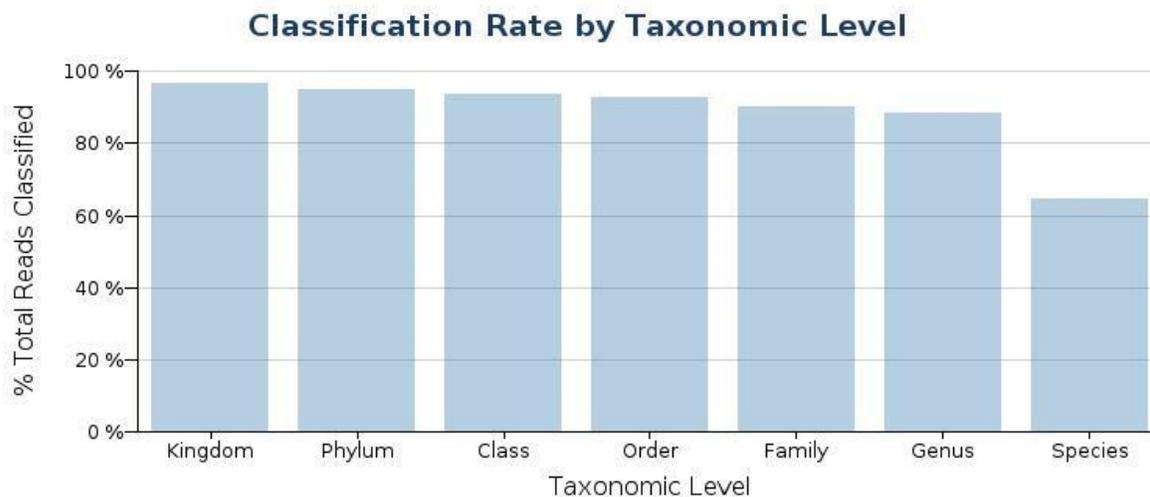
Sample ID:	9
Sample Name:	AI-09
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
101,047	101,047	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	97,631	96.62 %
Phylum	95,861	94.87 %
Class	94,421	93.44 %
Order	93,644	92.67 %
Family	91,164	90.22 %
Genus	89,358	88.43 %
Species	65,392	64.71 %



Classification Results by Taxonomic Level

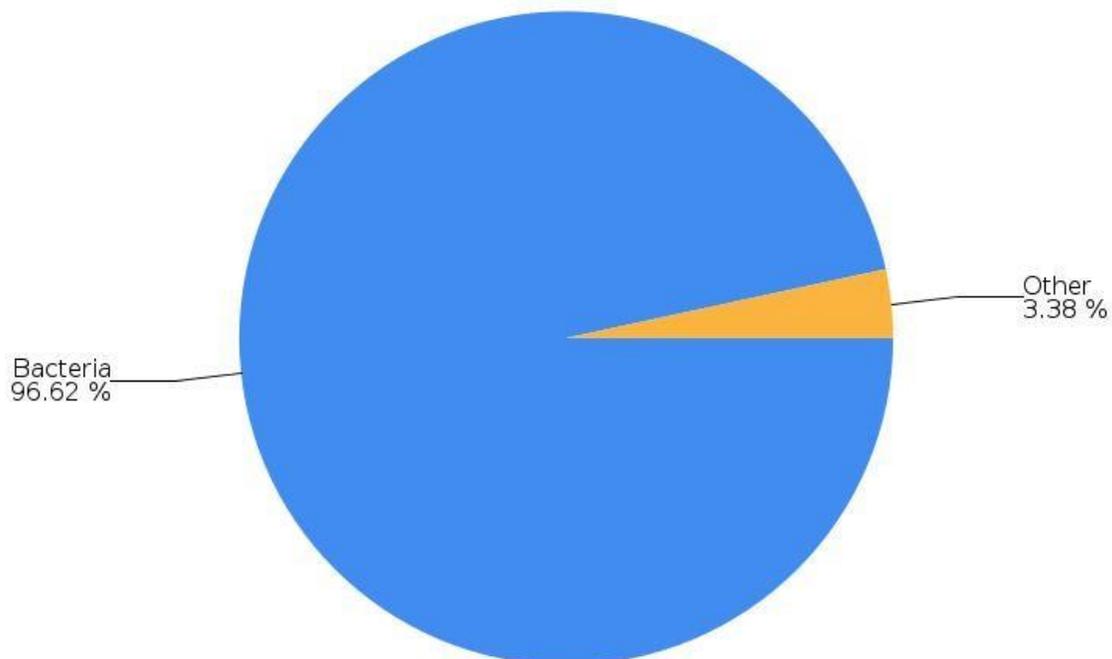
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

75 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	97,627	96.62 %
Unclassified at Kingdom level	3,416	3.38 %
Viruses	4	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



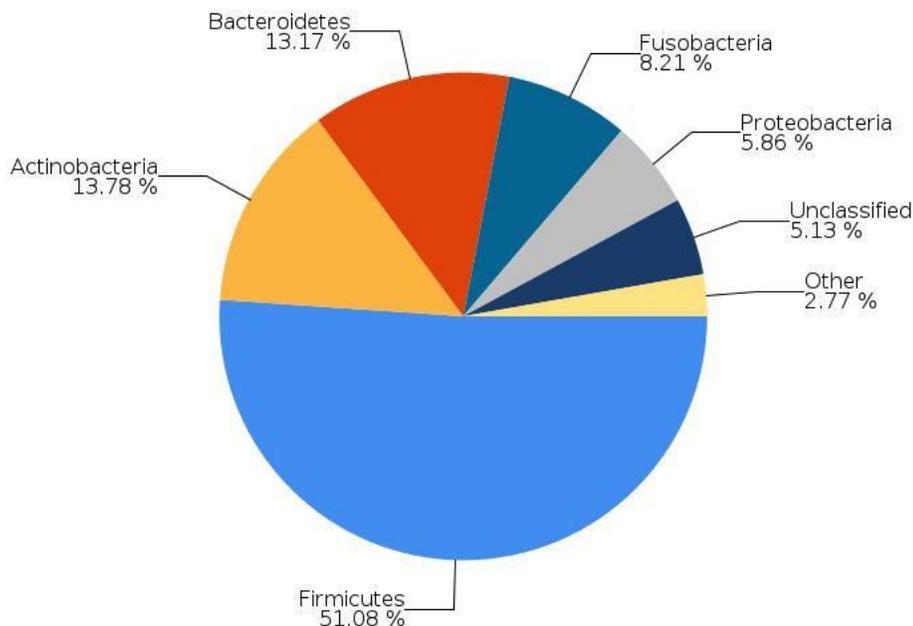
76 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	51,611	51.08 %
Actinobacteria	13,923	13.78 %
Bacteroidetes	13,310	13.17 %
Fusobacteria	8,294	8.21 %
Proteobacteria	5,926	5.86 %
Unclassified at Phylum level	5,186	5.13 %
Spirochaetes	1,922	1.90 %
Synergistetes	353	0.35 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 21. This table shows the top 8 of 21 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results

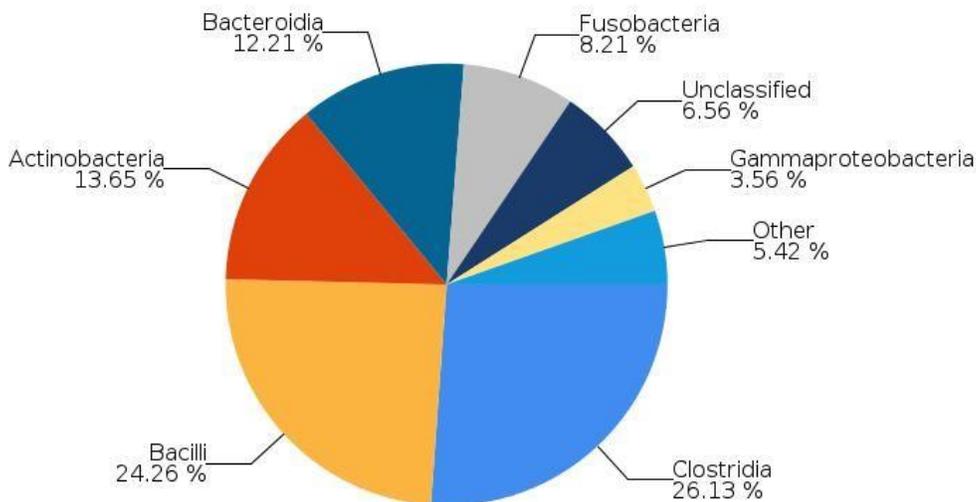


77 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridia	26,408	26.13 %
Bacilli	24,516	24.26 %
Actinobacteria	13,793	13.65 %
Bacteroidia	12,333	12.21 %
Fusobacteria	8,294	8.21 %
Unclassified at Class level	6,626	6.56 %
Gammaproteobacteria	3,602	3.56 %
Spirochaetes	1,922	1.90 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 34. This table shows the top 8 of 34 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



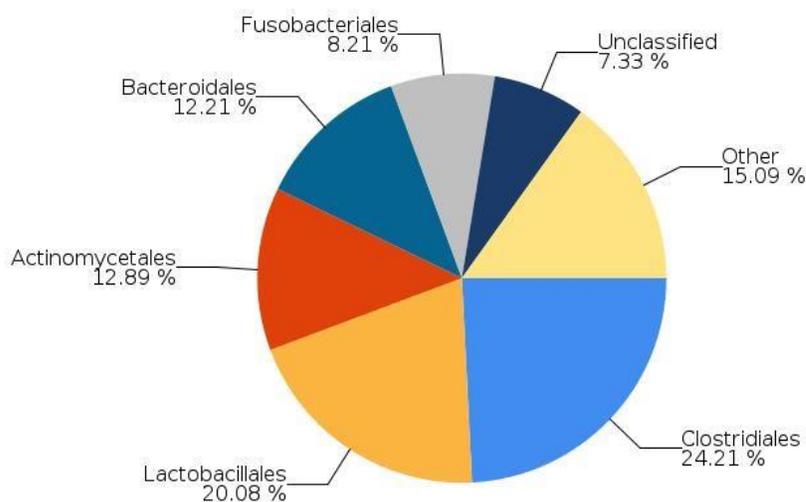
78 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridiales	24,459	24.21 %
Lactobacillales	20,291	20.08 %
Actinomycetales	13,022	12.89 %
Bacteroidales	12,333	12.21 %
Fusobacteriales	8,294	8.21 %
Unclassified at Order level	7,403	7.33 %
Pasteurellales	3,045	3.01 %
Gemellales	3,000	2.97 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 74. This table shows the top 8 of 74 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



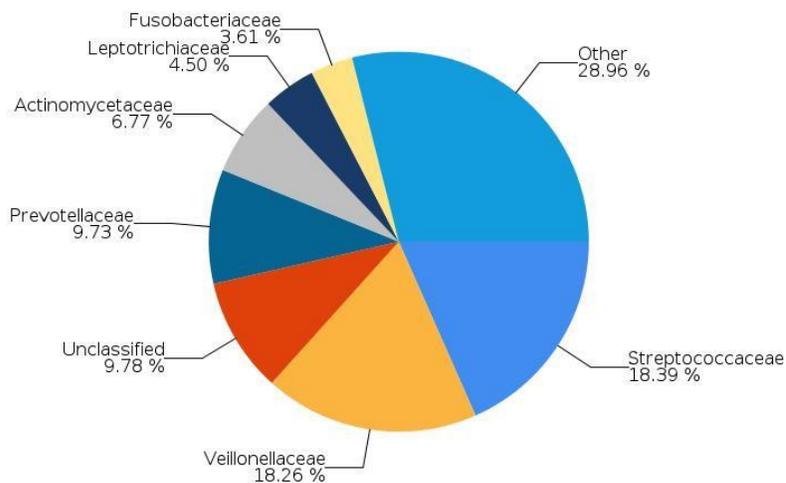
79 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	18,579	18.39 %
Veillonellaceae	18,456	18.26 %
Unclassified at Family level	9,883	9.78 %
Prevotellaceae	9,828	9.73 %
Actinomycetaceae	6,837	6.77 %
Leptotrichiaceae	4,552	4.50 %
Fusobacteriaceae	3,649	3.61 %
Pasteurellaceae	3,045	3.01 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 169. This table shows the top 8 of 169 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



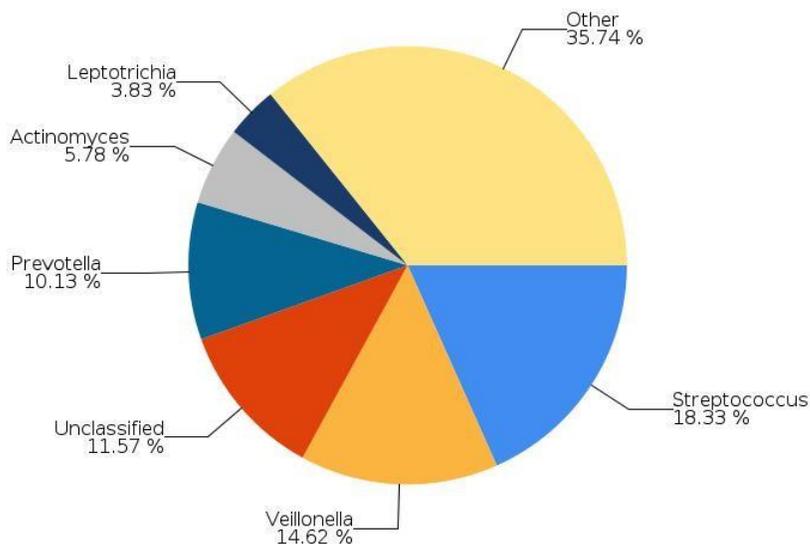
80 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	18,524	18.33 %
Veillonella	14,774	14.62 %
Unclassified at Genus level	11,689	11.57 %
Prevotella	10,232	10.13 %
Actinomyces	5,845	5.78 %
Leptotrichia	3,870	3.83 %
Fusobacterium	3,488	3.45 %
Gemella	3,000	2.97 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 341. This table shows the top 8 of 341 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



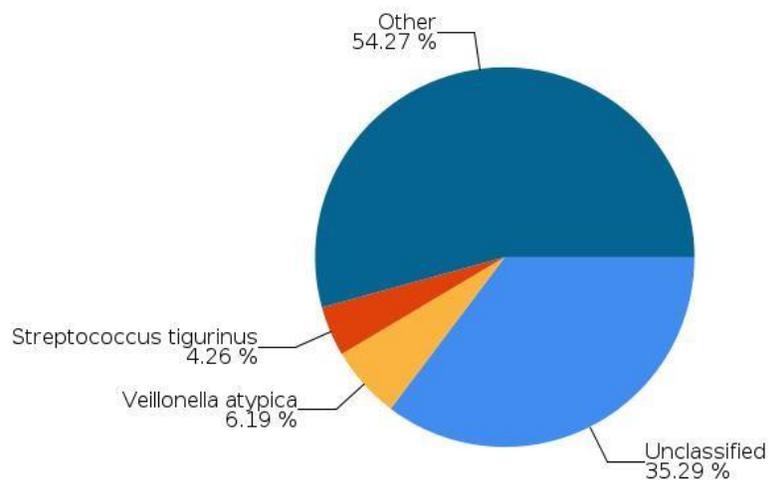
81 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	35,655	35.29 %
Veillonella atypica	6,250	6.19 %
Streptococcus tigurinus	4,308	4.26 %
Prevotella histicola	3,386	3.35 %
Veillonella dispar	2,820	2.79 %
Streptococcus vestibularis	2,134	2.11 %
Veillonella montpellierensis	1,611	1.59 %
Fusobacterium naviforme	1,520	1.50 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 515. This table shows the top 8 of 515 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-10

Report Date: 08/31/2018 18:17:25 (UTC)

Sample Configuration

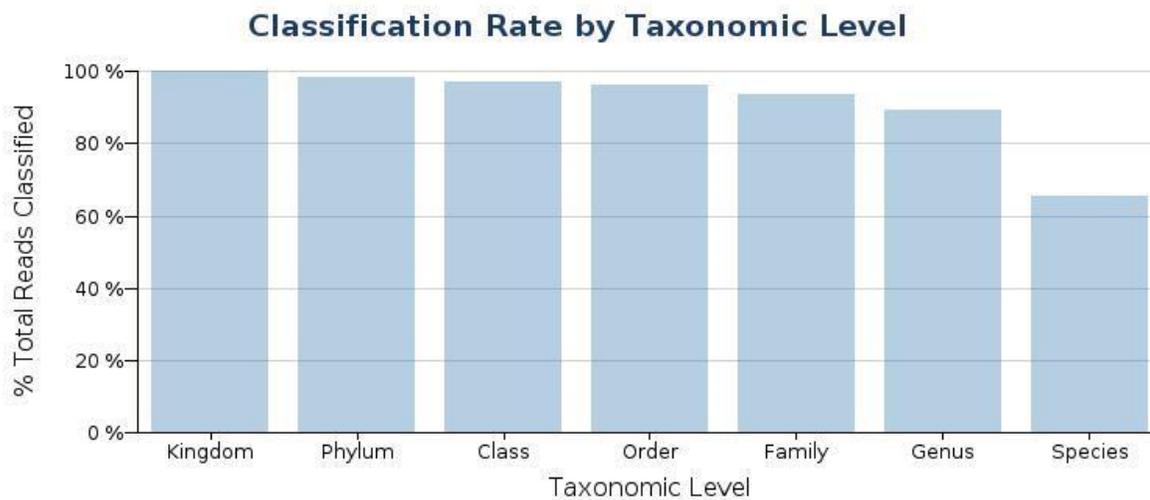
Sample ID:	10
Sample Name:	AI-10
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
89,182	89,182	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	89,109	99.92 %
Phylum	87,597	98.22 %
Class	86,408	96.89 %
Order	85,660	96.05 %
Family	83,427	93.55 %
Genus	79,670	89.33 %
Species	58,340	65.42 %



Classification Results by Taxonomic Level

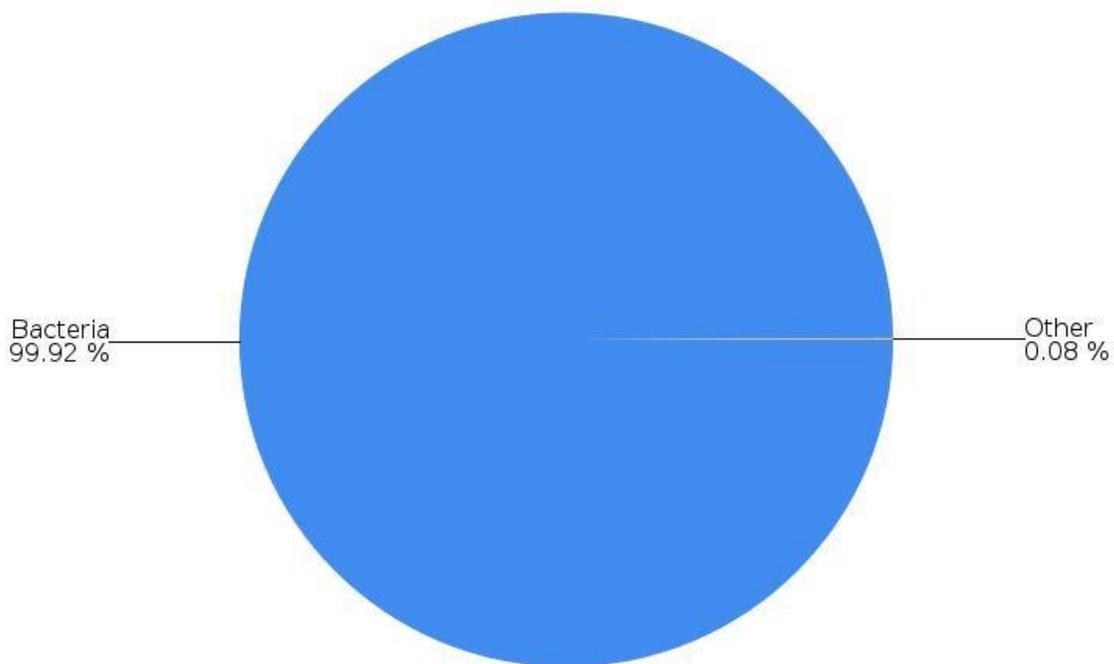
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

82 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	89,107	99.92 %
Unclassified at Kingdom level	73	0.08 %
Archaea	1	0.00 %
Viruses	1	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



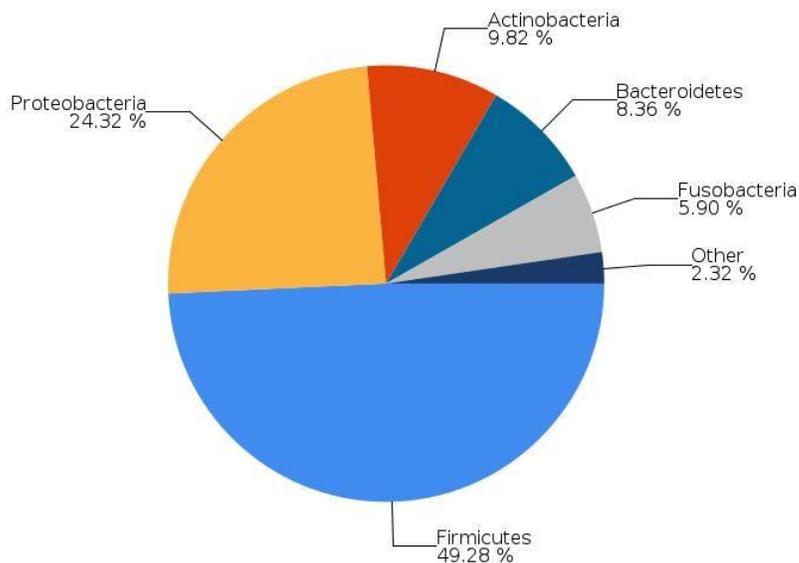
83 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	43,946	49.28 %
Proteobacteria	21,691	24.32 %
Actinobacteria	8,755	9.82 %
Bacteroidetes	7,458	8.36 %
Fusobacteria	5,265	5.90 %
Unclassified at Phylum level	1,585	1.78 %
Spirochaetes	304	0.34 %
Cyanobacteria	37	0.04 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 21. This table shows the top 8 of 21 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



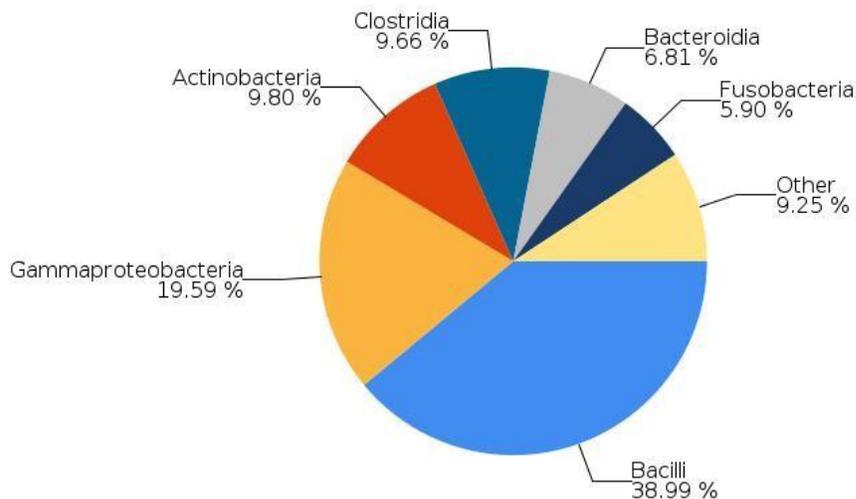
84 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	34,768	38.99 %
Gammaproteobacteria	17,470	19.59 %
Actinobacteria	8,738	9.80 %
Clostridia	8,614	9.66 %
Bacteroidia	6,077	6.81 %
Fusobacteria	5,265	5.90 %
Betaproteobacteria	3,114	3.49 %
Unclassified at Class level	2,774	3.11 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 35. This table shows the top 8 of 35 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



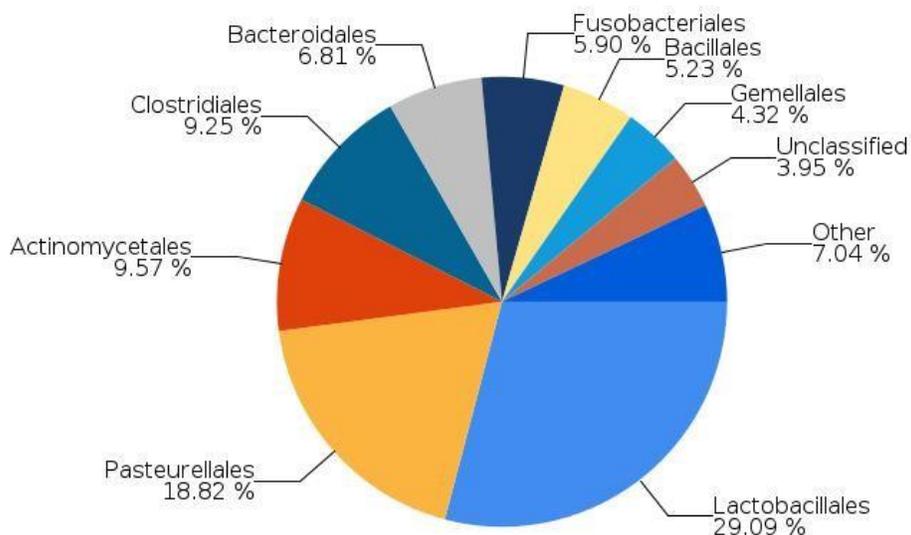
85 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	25,946	29.09 %
Pasteurellales	16,786	18.82 %
Actinomycetales	8,535	9.57 %
Clostridiales	8,248	9.25 %
Bacteroidales	6,077	6.81 %
Fusobacteriales	5,265	5.90 %
Bacillales	4,668	5.23 %
Gemellales	3,853	4.32 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 76. This table shows the top 8 of 76 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



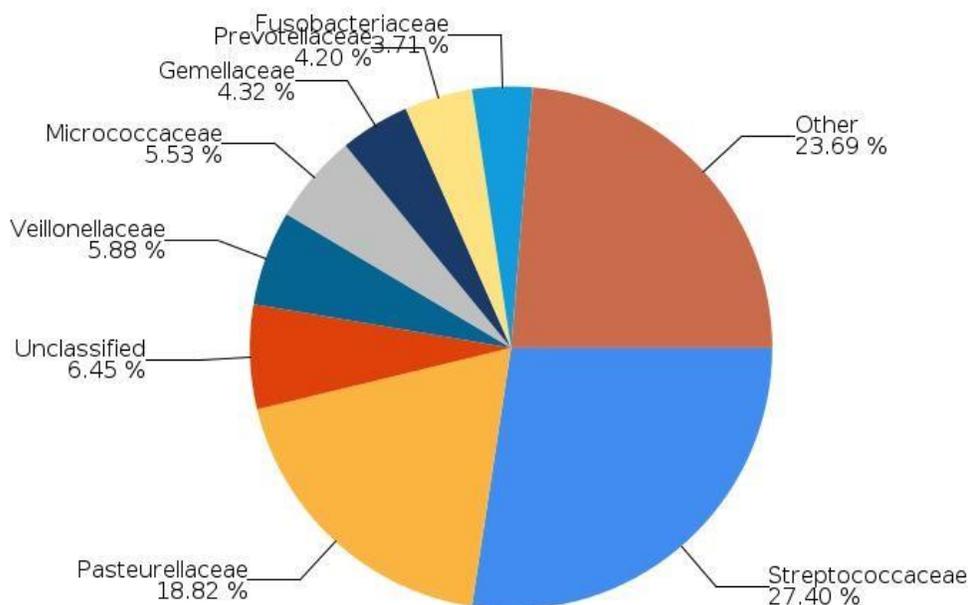
86 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	24,434	27.40 %
Pasteurellaceae	16,786	18.82 %
Unclassified at Family level	5,755	6.45 %
Veillonellaceae	5,242	5.88 %
Micrococcaceae	4,931	5.53 %
Gemellaceae	3,853	4.32 %
Prevotellaceae	3,749	4.20 %
Fusobacteriaceae	3,308	3.71 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 166. This table shows the top 8 of 166 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



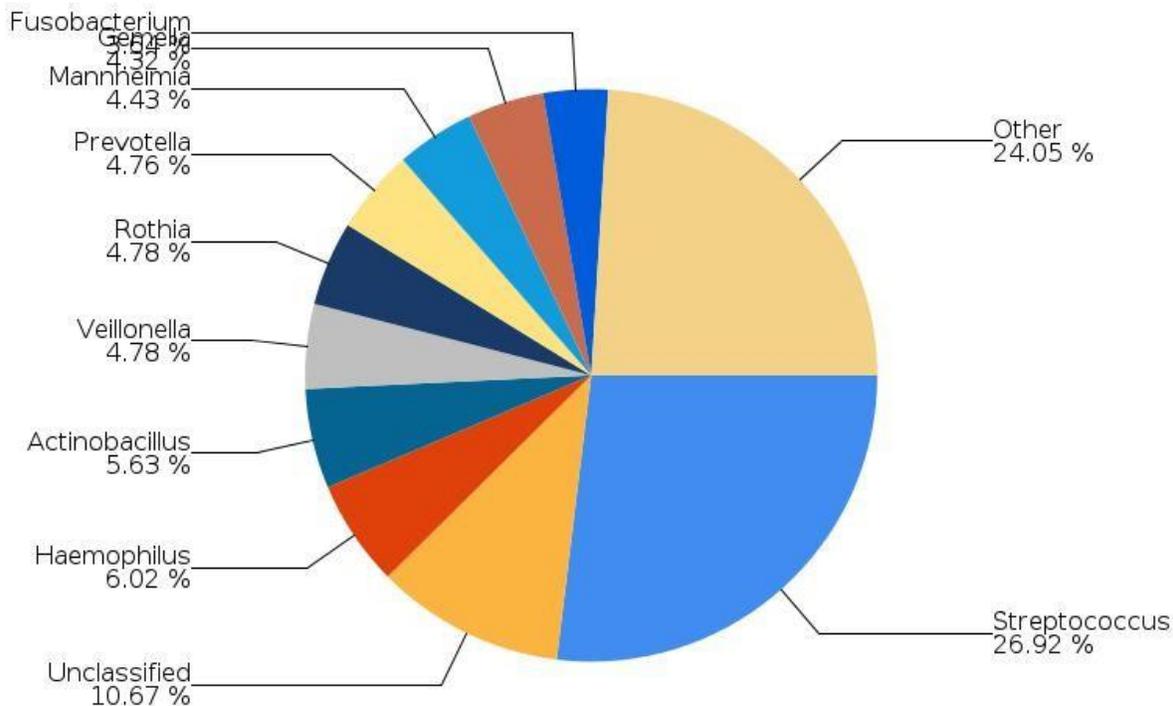
87 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	24,010	26.92 %
Unclassified at Genus level	9,512	10.67 %
Haemophilus	5,367	6.02 %
Actinobacillus	5,025	5.63 %
Veillonella	4,265	4.78 %
Rothia	4,262	4.78 %
Prevotella	4,244	4.76 %
Mannheimia	3,948	4.43 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 345. This table shows the top 8 of 345 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



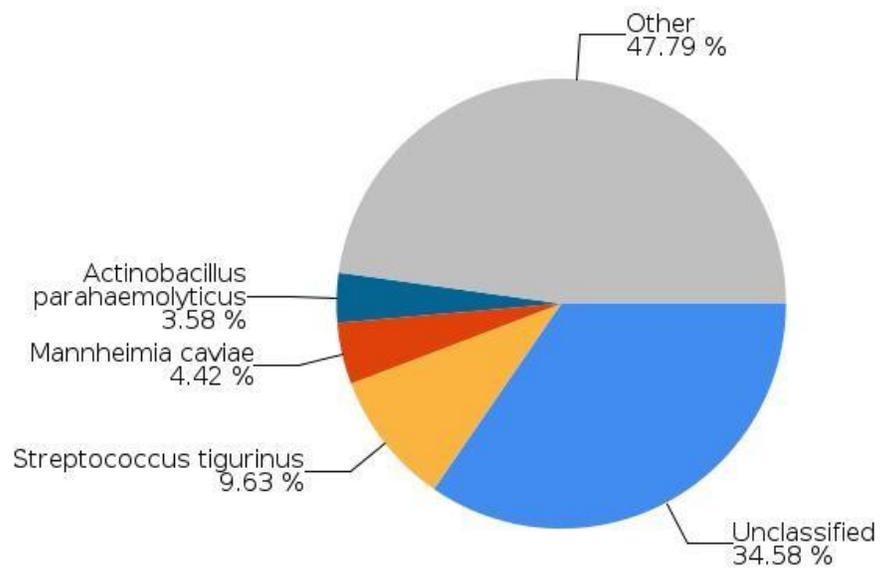
88 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	30,842	34.58 %
Streptococcus tigurinus	8,588	9.63 %
Mannheimia caviae	3,943	4.42 %
Actinobacillus parahaemolyticus	3,189	3.58 %
Streptococcus pseudopneumoniae	2,232	2.50 %
Haemophilus parainfluenzae	2,128	2.39 %
Gemella cunicula	1,751	1.96 %
Streptococcus oralis	1,709	1.92 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 521. This table shows the top 8 of 521 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-11

Report Date: 08/31/2018 18:16:51 (UTC)

Sample Configuration

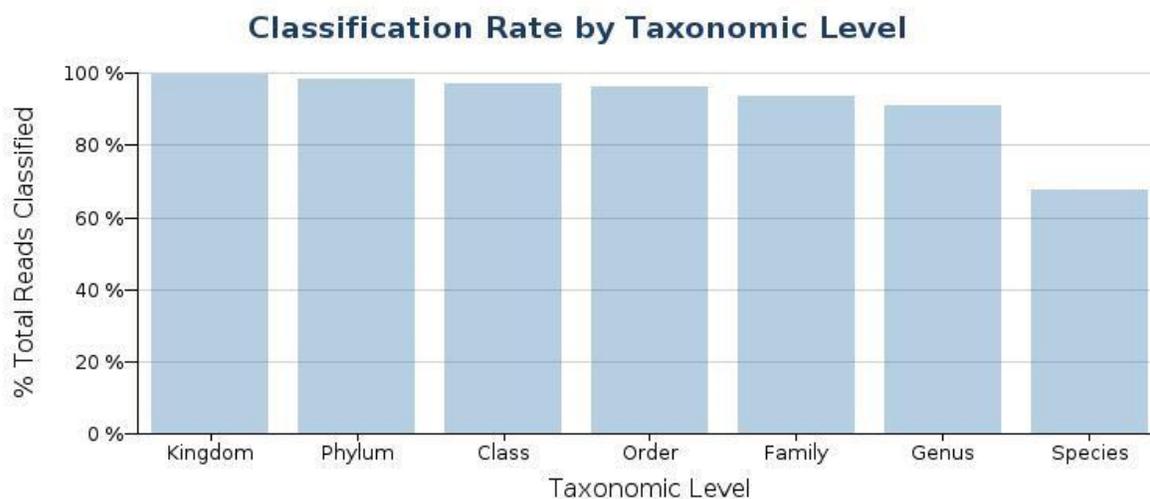
Sample ID:	11
Sample Name:	AI-11
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
92,448	92,448	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	92,313	99.85 %
Phylum	90,749	98.16 %
Class	89,769	97.10 %
Order	88,911	96.17 %
Family	86,486	93.55 %
Genus	84,041	90.91 %
Species	62,647	67.76 %



Classification Results by Taxonomic Level

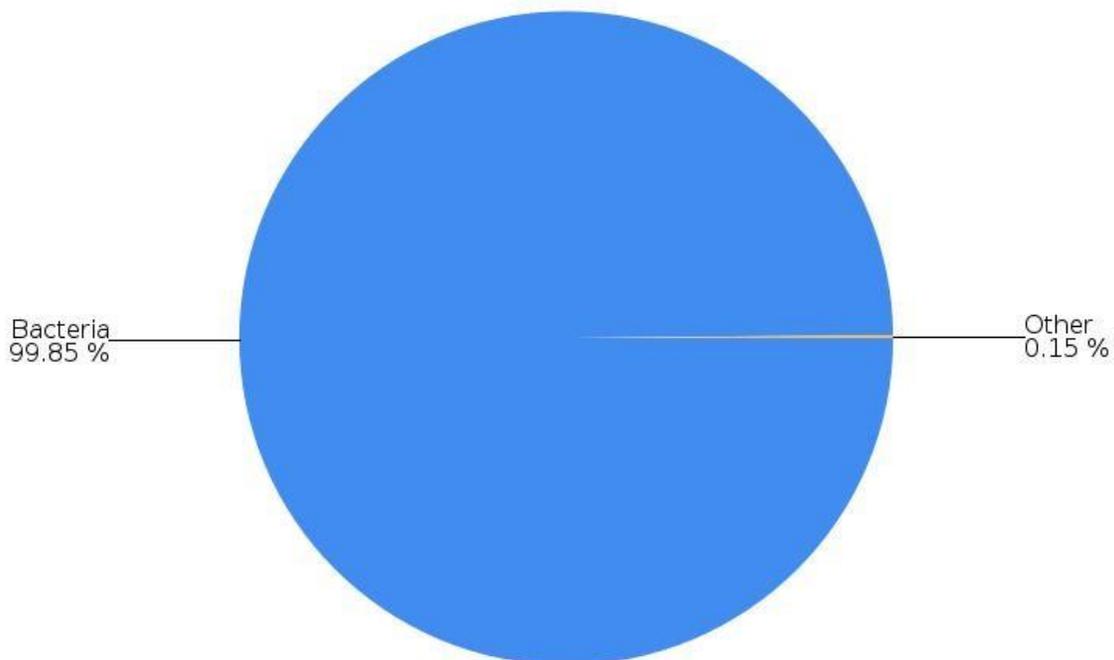
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

89 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	92,311	99.85 %
Unclassified at Kingdom level	135	0.15 %
Viruses	2	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results

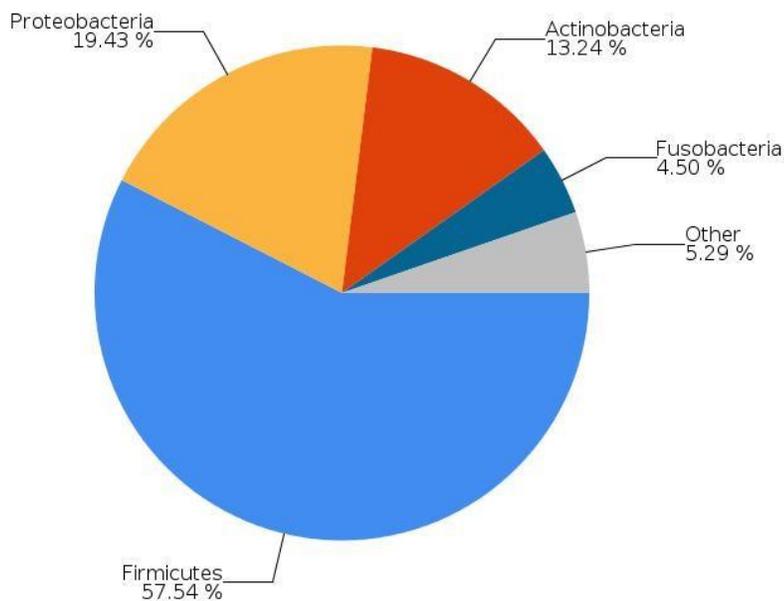


90 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	53,191	57.54 %
Proteobacteria	17,967	19.43 %
Actinobacteria	12,241	13.24 %
Fusobacteria	4,159	4.50 %
Bacteroidetes	2,537	2.74 %
Unclassified at Phylum level	1,699	1.84 %
Spirochaetes	387	0.42 %
Cyanobacteria	81	0.09 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 22. This table shows the top 8 of 22 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



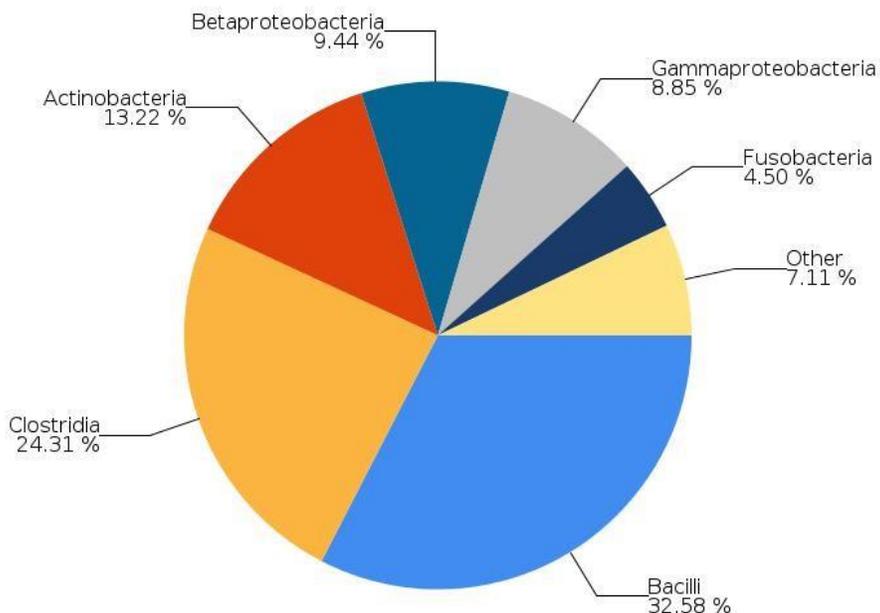
91 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	30,117	32.58 %
Clostridia	22,473	24.31 %
Actinobacteria	12,223	13.22 %
Betaproteobacteria	8,726	9.44 %
Gammaproteobacteria	8,179	8.85 %
Fusobacteria	4,159	4.50 %
Unclassified at Class level	2,679	2.90 %
Bacteroidia	1,538	1.66 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 38. This table shows the top 8 of 38 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



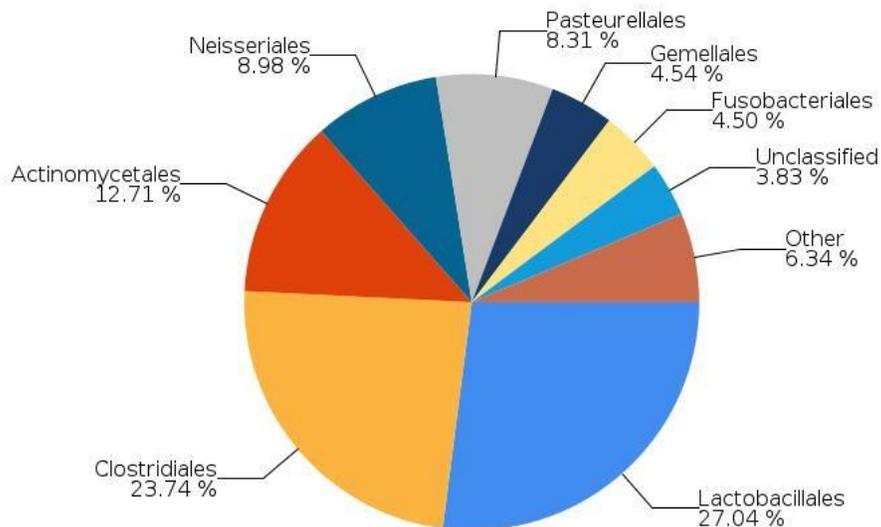
92 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	25,001	27.04 %
Clostridiales	21,945	23.74 %
Actinomycetales	11,754	12.71 %
Neisseriales	8,303	8.98 %
Pasteurellales	7,686	8.31 %
Gemellales	4,200	4.54 %
Fusobacteriales	4,159	4.50 %
Unclassified at Order level	3,537	3.83 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 79. This table shows the top 8 of 79 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



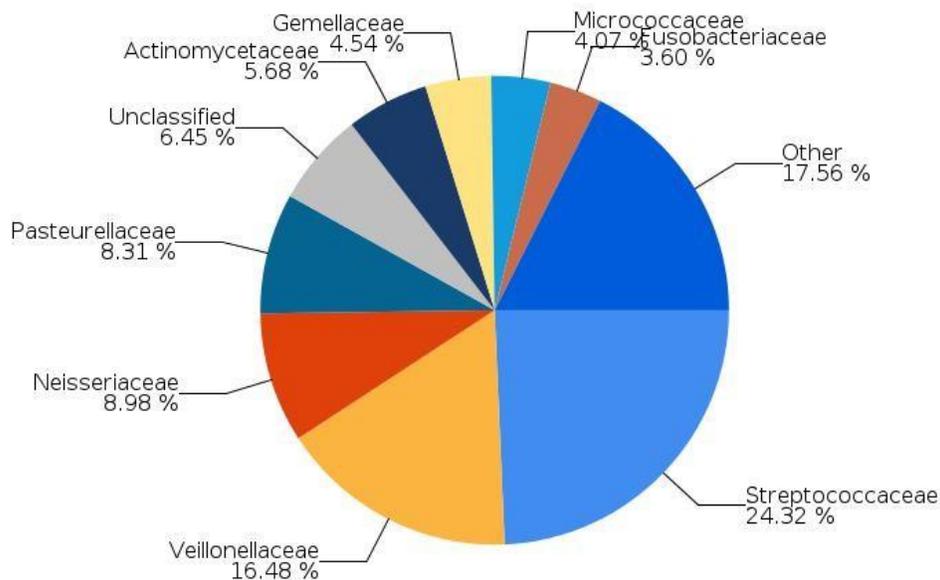
93 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	22,484	24.32 %
Veillonellaceae	15,236	16.48 %
Neisseriaceae	8,303	8.98 %
Pasteurellaceae	7,686	8.31 %
Unclassified at Family level	5,962	6.45 %
Actinomycetaceae	5,249	5.68 %
Gemellaceae	4,200	4.54 %
Micrococcaceae	3,764	4.07 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 167. This table shows the top 8 of 167 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



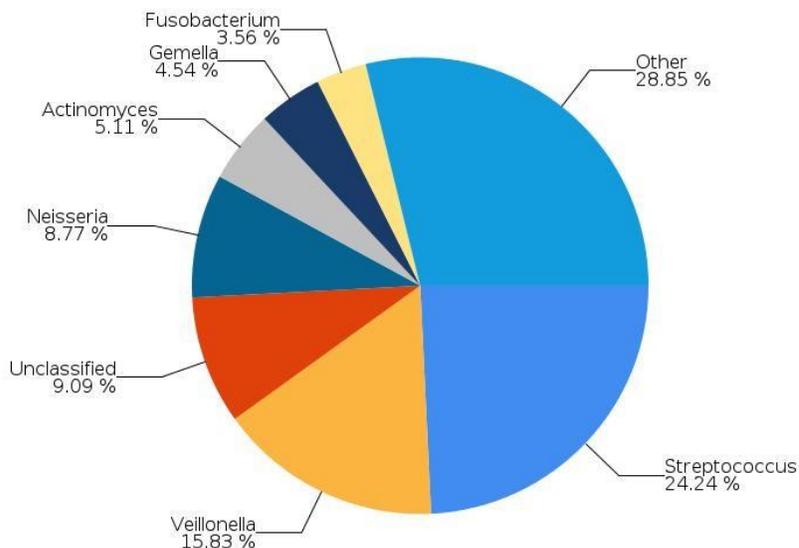
94 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	22,411	24.24 %
Veillonella	14,636	15.83 %
Unclassified at Genus level	8,407	9.09 %
Neisseria	8,109	8.77 %
Actinomyces	4,722	5.11 %
Gemella	4,200	4.54 %
Fusobacterium	3,293	3.56 %
Haemophilus	3,152	3.41 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 331. This table shows the top 8 of 331 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



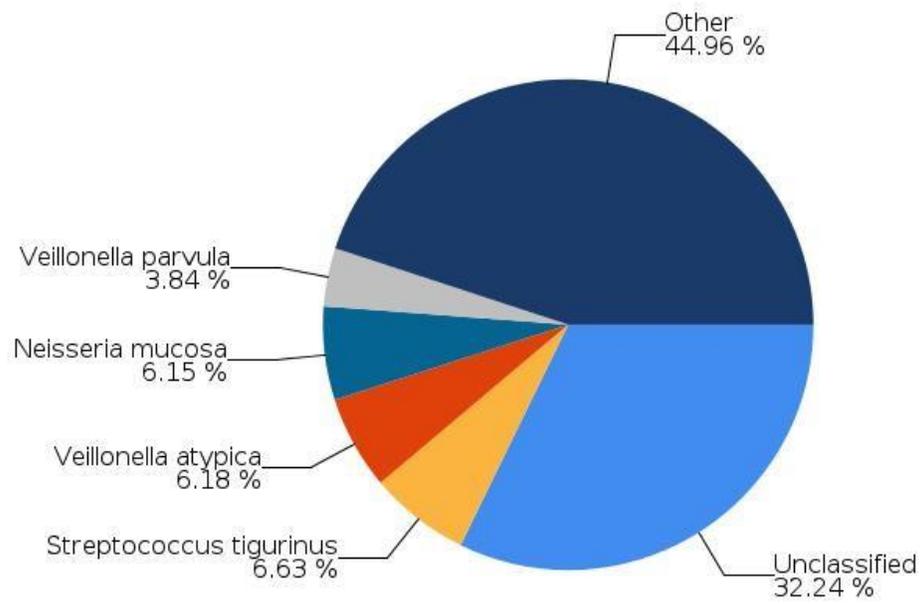
95 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	29,801	32.24 %
Streptococcus tigurinus	6,127	6.63 %
Veillonella atypica	5,713	6.18 %
Neisseria mucosa	5,687	6.15 %
Veillonella parvula	3,551	3.84 %
Haemophilus parainfluenzae	2,863	3.10 %
Mannheimia caviae	2,664	2.88 %
Gemella cunicula	2,206	2.39 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 462. This table shows the top 8 of 462 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-12

Report Date: 08/31/2018 18:16:50 (UTC)

Sample Configuration

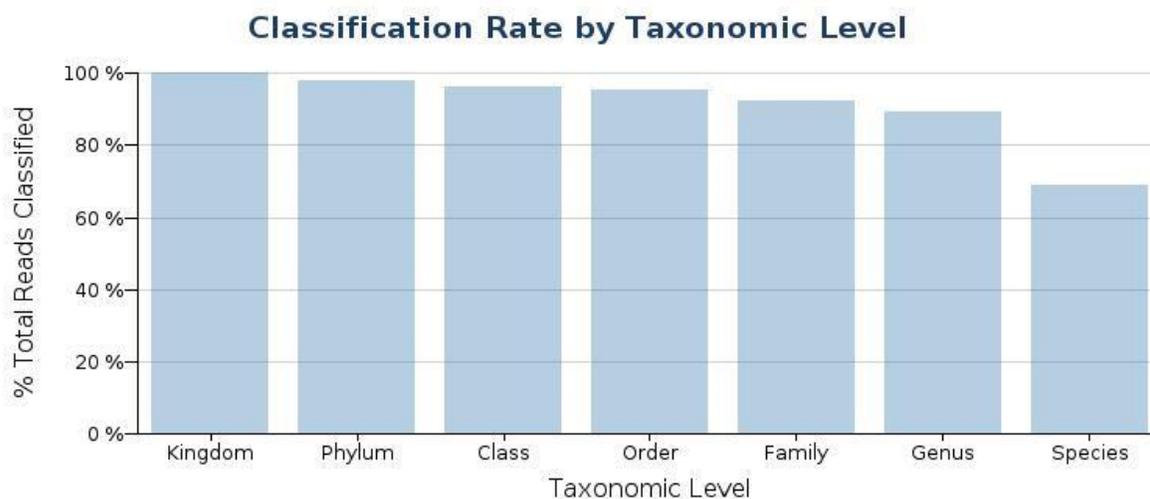
Sample ID:	12
Sample Name:	AI-12
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
86,860	86,860	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	86,764	99.89 %
Phylum	85,070	97.94 %
Class	83,627	96.28 %
Order	82,795	95.32 %
Family	80,176	92.30 %
Genus	77,471	89.19 %
Species	59,979	69.05 %



Classification Results by Taxonomic Level

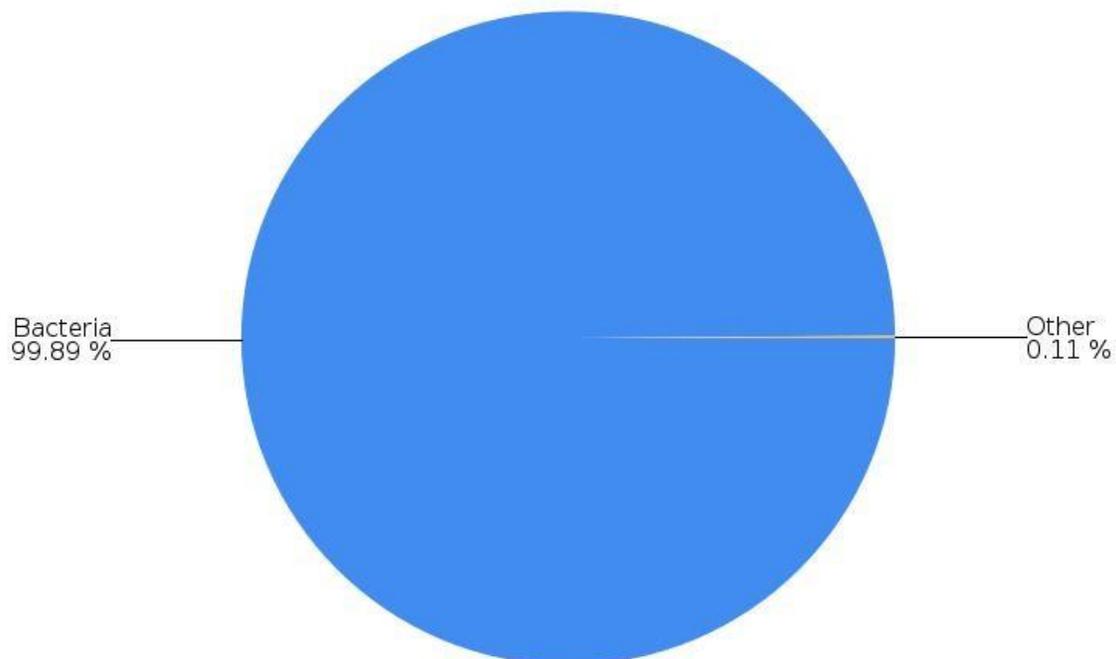
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

96 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	86,762	99.89 %
Unclassified at Kingdom level	96	0.11 %
Viruses	2	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



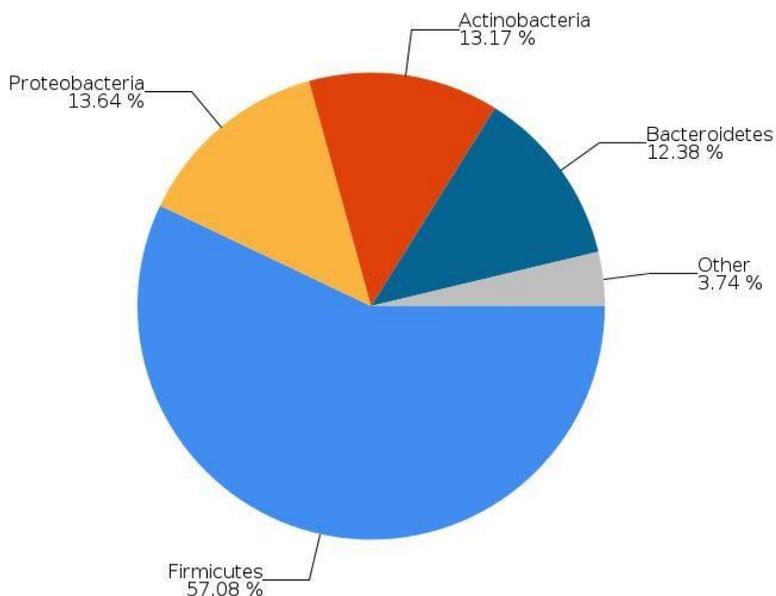
97 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	49,579	57.08 %
Proteobacteria	11,845	13.64 %
Actinobacteria	11,438	13.17 %
Bacteroidetes	10,752	12.38 %
Unclassified at Phylum level	1,790	2.06 %
Fusobacteria	989	1.14 %
Spirochaetes	176	0.20 %
Cyanobacteria	91	0.10 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 21. This table shows the top 8 of 21 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



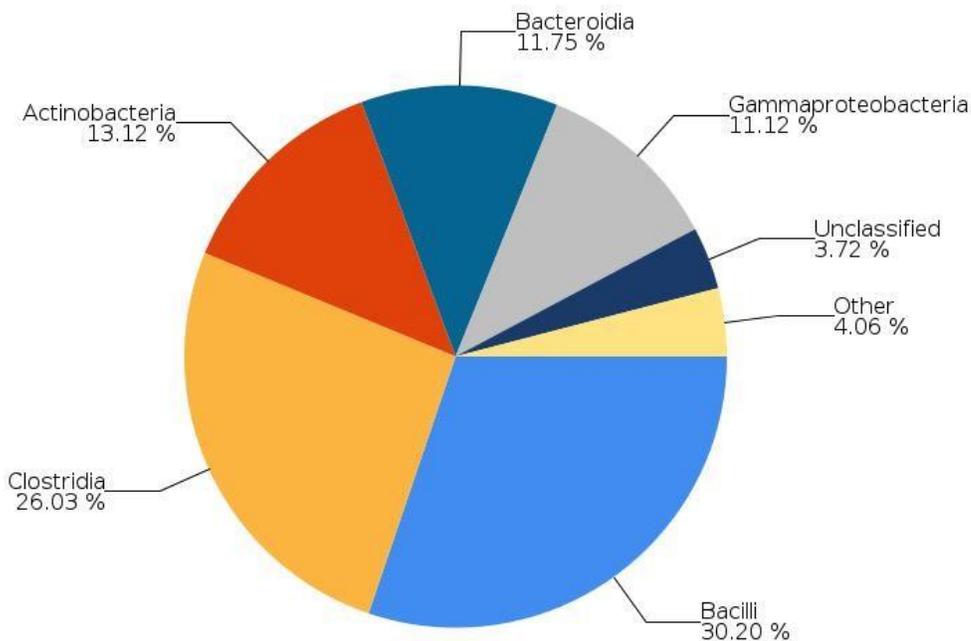
98 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	26,234	30.20 %
Clostridia	22,609	26.03 %
Actinobacteria	11,400	13.12 %
Bacteroidia	10,202	11.75 %
Gammaproteobacteria	9,658	11.12 %
Unclassified at Class level	3,233	3.72 %
Fusobacteria	989	1.14 %
Betaproteobacteria	967	1.11 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 37. This table shows the top 8 of 37 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



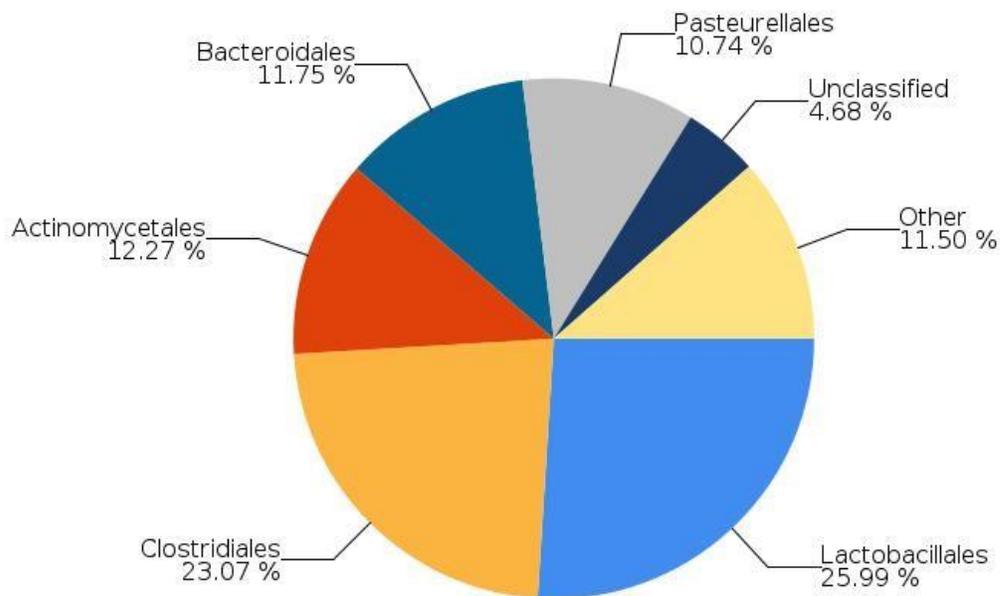
99 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	22,574	25.99 %
Clostridiales	20,042	23.07 %
Actinomycetales	10,656	12.27 %
Bacteroidales	10,202	11.75 %
Pasteurellales	9,332	10.74 %
Unclassified at Order level	4,065	4.68 %
Coriobacteriales	2,328	2.68 %
Gemellales	2,157	2.48 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 77. This table shows the top 8 of 77 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



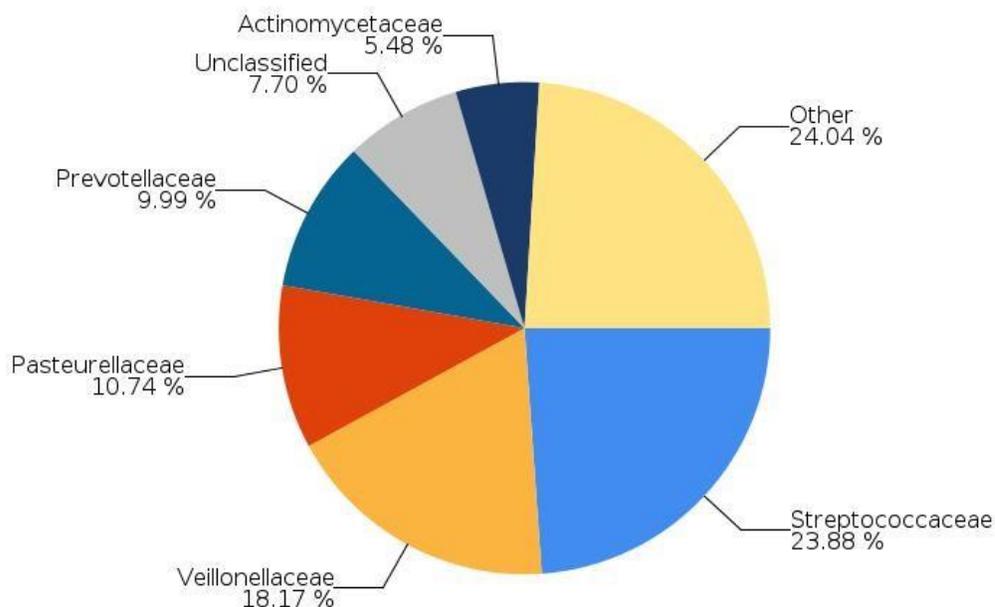
100 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	20,741	23.88 %
Veillonellaceae	15,783	18.17 %
Pasteurellaceae	9,332	10.74 %
Prevotellaceae	8,680	9.99 %
Unclassified at Family level	6,684	7.70 %
Actinomycetaceae	4,762	5.48 %
Micrococcaceae	2,582	2.97 %
Coriobacteriaceae	2,328	2.68 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 161. This table shows the top 8 of 161 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



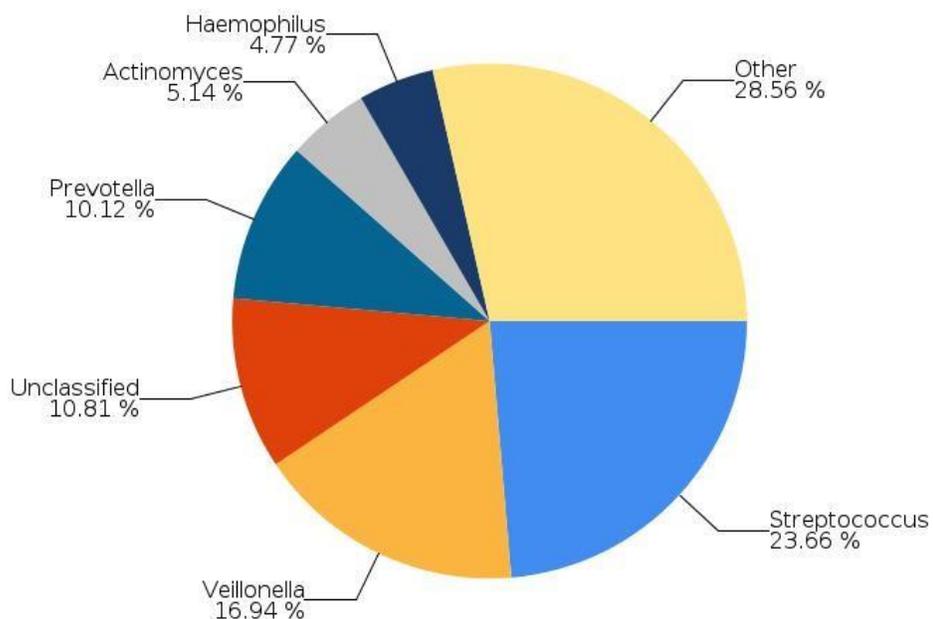
101 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	20,550	23.66 %
Veillonella	14,716	16.94 %
Unclassified at Genus level	9,389	10.81 %
Prevotella	8,790	10.12 %
Actinomyces	4,466	5.14 %
Haemophilus	4,142	4.77 %
Mannheimia	2,957	3.40 %
Atopobium	2,294	2.64 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 322. This table shows the top 8 of 322 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



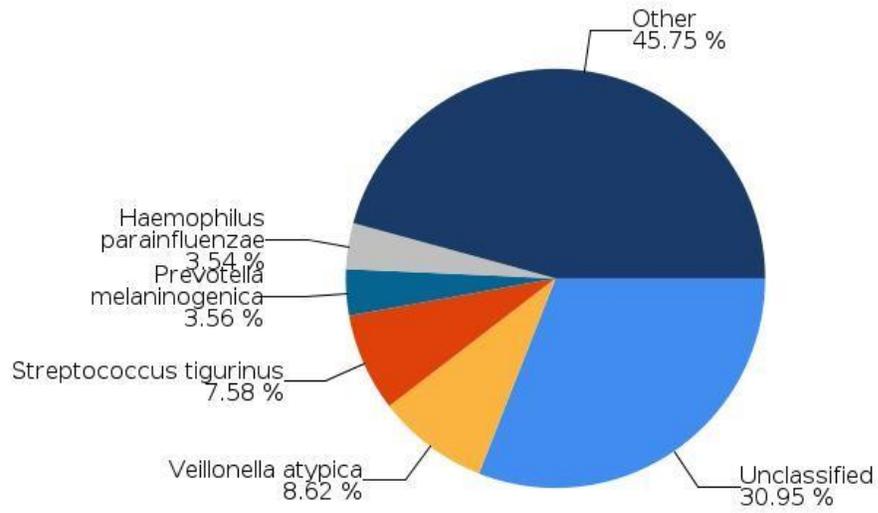
102 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	26,881	30.95 %
Veillonella atypica	7,484	8.62 %
Streptococcus tigurinus	6,587	7.58 %
Prevotella melaninogenica	3,095	3.56 %
Haemophilus parainfluenzae	3,077	3.54 %
Mannheimia caviae	2,956	3.40 %
Veillonella dispar	1,786	2.06 %
Prevotella histicola	1,750	2.01 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 467. This table shows the top 8 of 467 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-13

Report Date: 08/31/2018 18:16:52 (UTC)

Sample Configuration

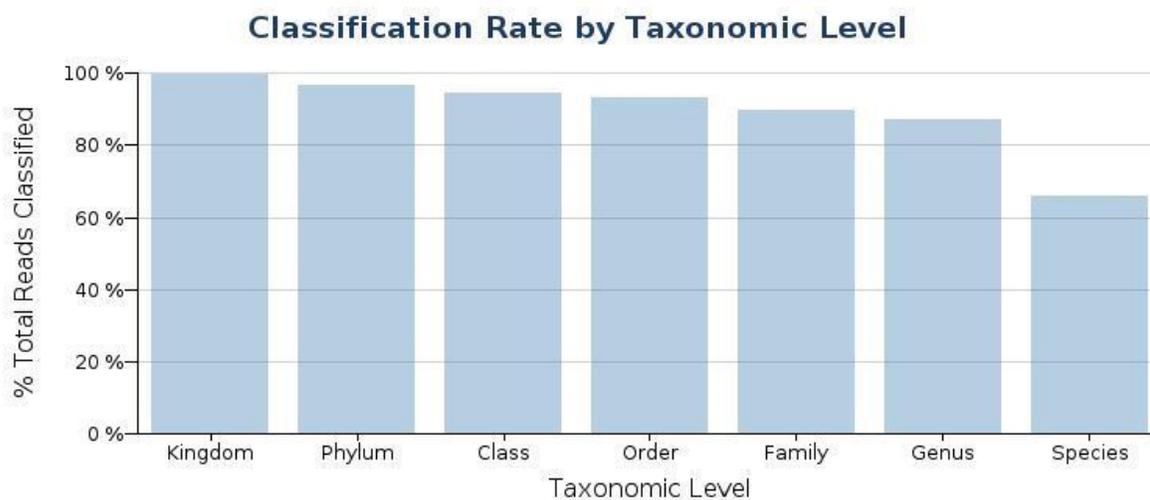
Sample ID:	13
Sample Name:	AI-13
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
89,075	89,075	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	88,842	99.74 %
Phylum	86,216	96.79 %
Class	84,012	94.32 %
Order	82,874	93.04 %
Family	80,106	89.93 %
Genus	77,748	87.28 %
Species	58,672	65.87 %



Classification Results by Taxonomic Level

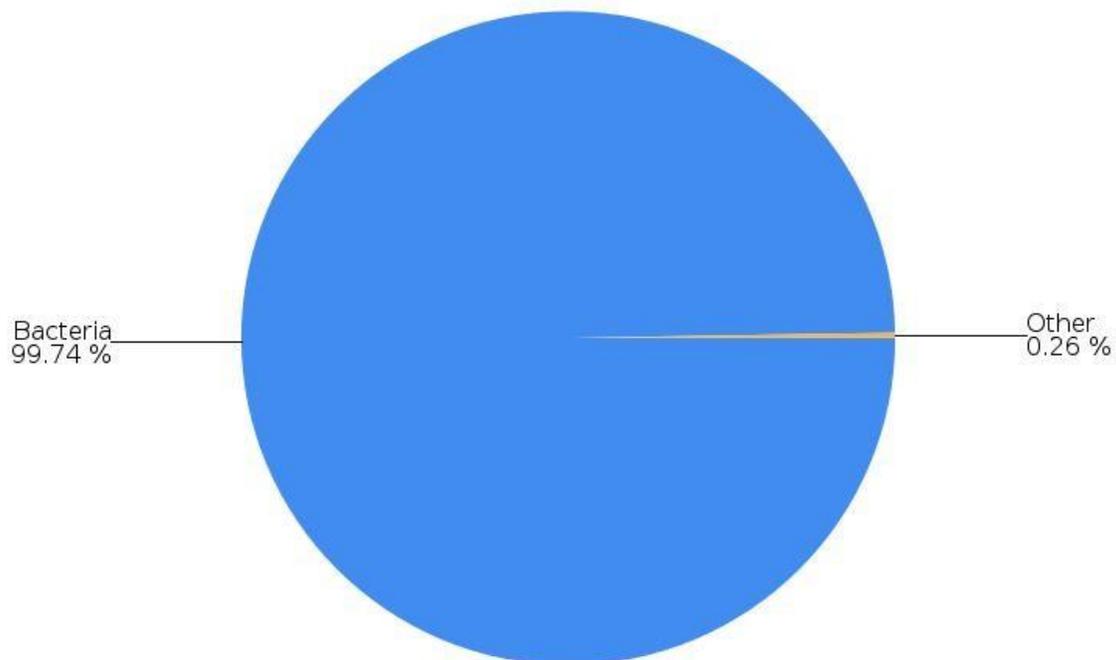
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

103 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	88,842	99.74 %
Unclassified at Kingdom level	233	0.26 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results

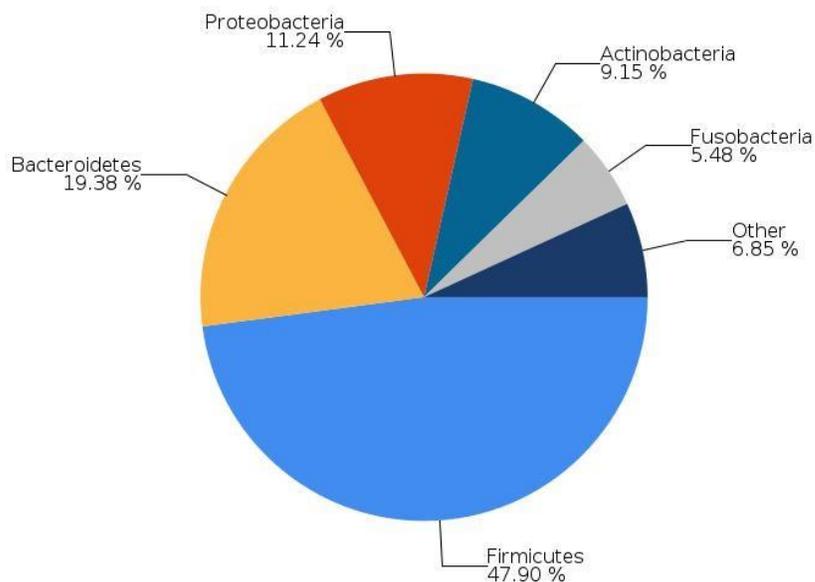


104 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	42,671	47.90 %
Bacteroidetes	17,259	19.38 %
Proteobacteria	10,009	11.24 %
Actinobacteria	8,154	9.15 %
Fusobacteria	4,877	5.48 %
Unclassified at Phylum level	2,859	3.21 %
Spirochaetes	1,751	1.97 %
Synergistetes	667	0.75 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 23. This table shows the top 8 of 23 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results

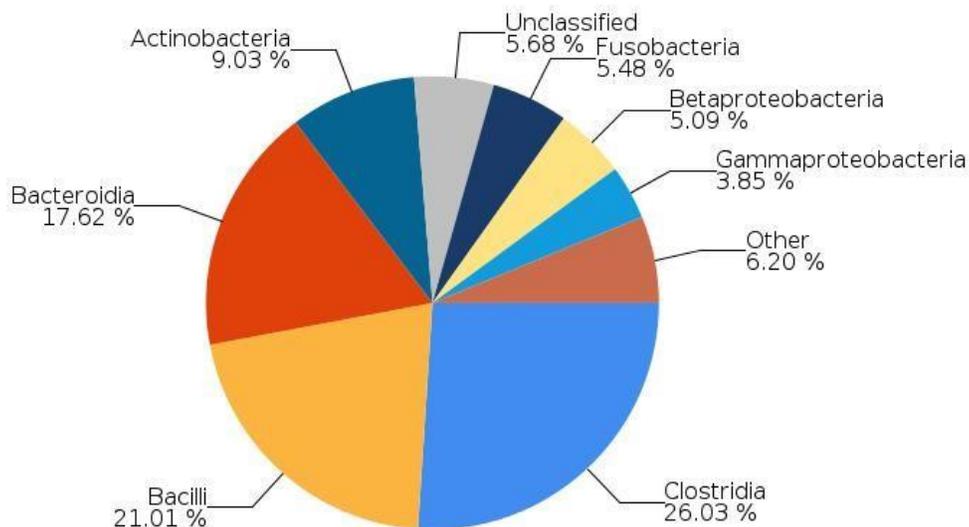


105 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridia	23,185	26.03 %
Bacilli	18,718	21.01 %
Bacteroidia	15,697	17.62 %
Actinobacteria	8,041	9.03 %
Unclassified at Class level	5,063	5.68 %
Fusobacteria	4,877	5.48 %
Betaproteobacteria	4,538	5.09 %
Gammaproteobacteria	3,433	3.85 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 39. This table shows the top 8 of 39 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



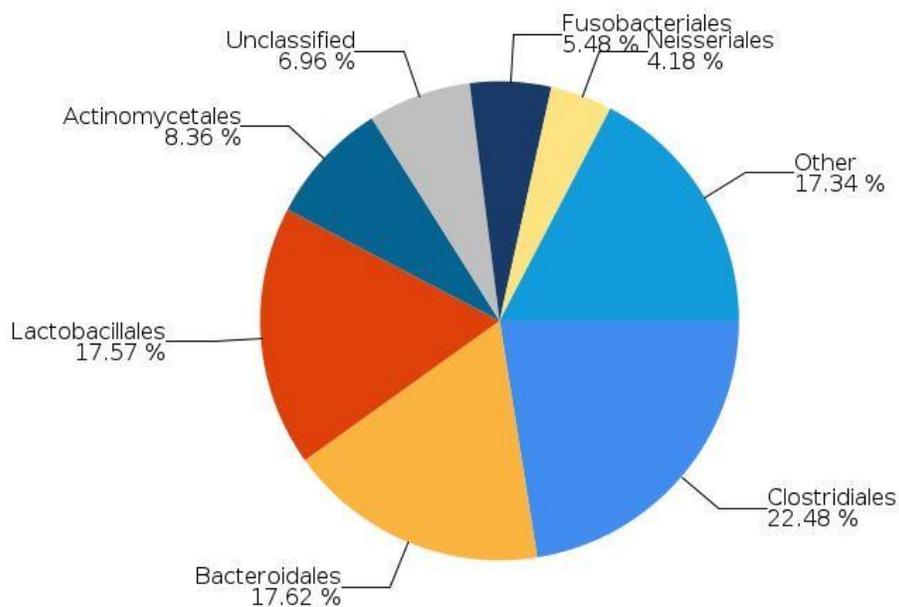
106 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridiales	20,028	22.48 %
Bacteroidales	15,697	17.62 %
Lactobacillales	15,651	17.57 %
Actinomycetales	7,450	8.36 %
Unclassified at Order level	6,201	6.96 %
Fusobacteriales	4,877	5.48 %
Neisseriales	3,723	4.18 %
Pasteurellales	2,757	3.10 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 84. This table shows the top 8 of 84 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



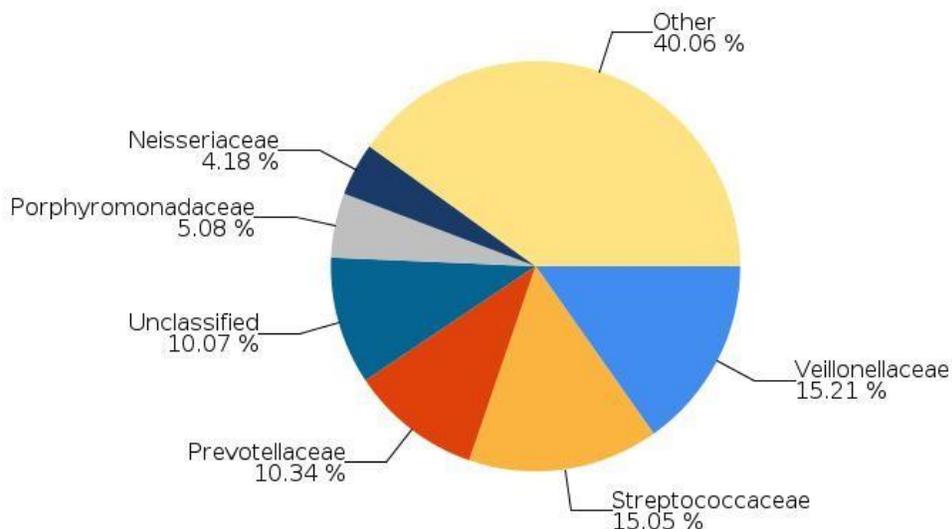
107 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Veillonellaceae	13,549	15.21 %
Streptococcaceae	13,410	15.05 %
Prevotellaceae	9,208	10.34 %
Unclassified at Family level	8,969	10.07 %
Porphyromonadaceae	4,529	5.08 %
Neisseriaceae	3,723	4.18 %
Fusobacteriaceae	2,783	3.12 %
Pasteurellaceae	2,757	3.10 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 183. This table shows the top 8 of 183 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



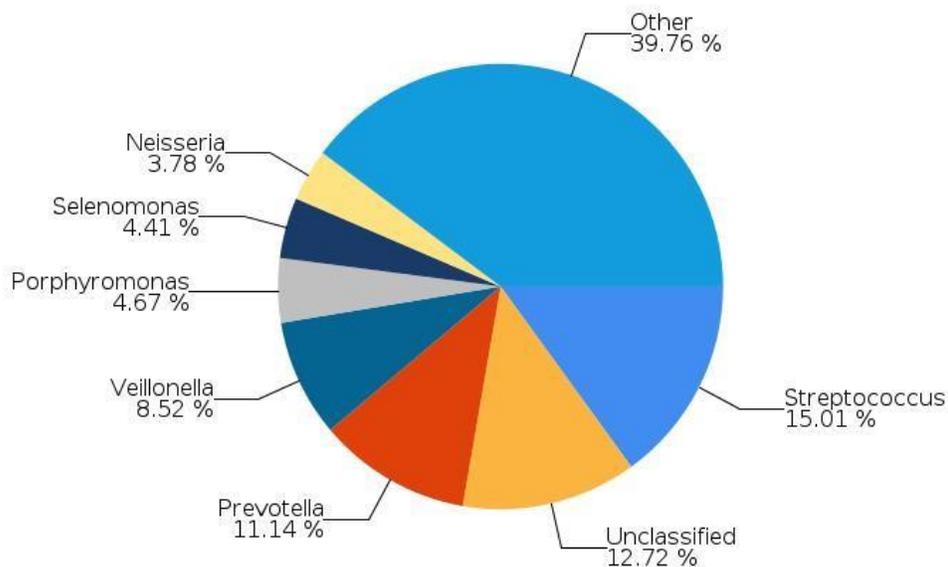
108 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	13,371	15.01 %
Unclassified at Genus level	11,327	12.72 %
Prevotella	9,922	11.14 %
Veillonella	7,587	8.52 %
Porphyromonas	4,157	4.67 %
Selenomonas	3,930	4.41 %
Neisseria	3,365	3.78 %
Fusobacterium	2,711	3.04 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 387. This table shows the top 8 of 387 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



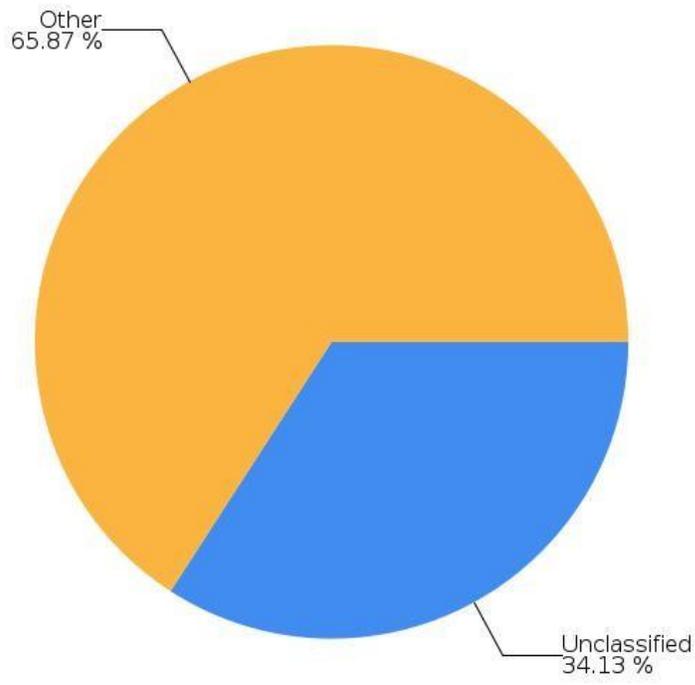
109 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	30,403	34.13 %
Streptococcus tigurinus	3,029	3.40 %
Veillonella atypica	2,723	3.06 %
Selenomonas infelix	2,592	2.91 %
Neisseria mucosa	2,479	2.78 %
Prevotella multiformis	2,415	2.71 %
Porphyromonas gingivalis	2,396	2.69 %
Streptococcus vestibularis	1,743	1.96 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 579. This table shows the top 8 of 579 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-14

Report Date: 08/31/2018 18:16:57 (UTC)

Sample Configuration

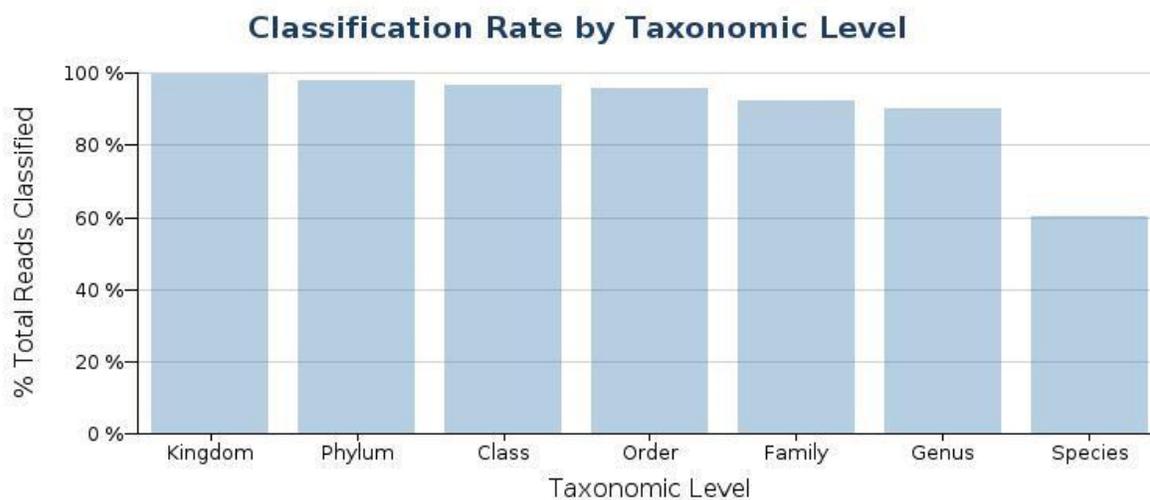
Sample ID:	14
Sample Name:	AI-14
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
80,141	80,141	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	79,992	99.81 %
Phylum	78,558	98.02 %
Class	77,609	96.84 %
Order	76,603	95.59 %
Family	73,911	92.23 %
Genus	72,280	90.19 %
Species	48,485	60.50 %



Classification Results by Taxonomic Level

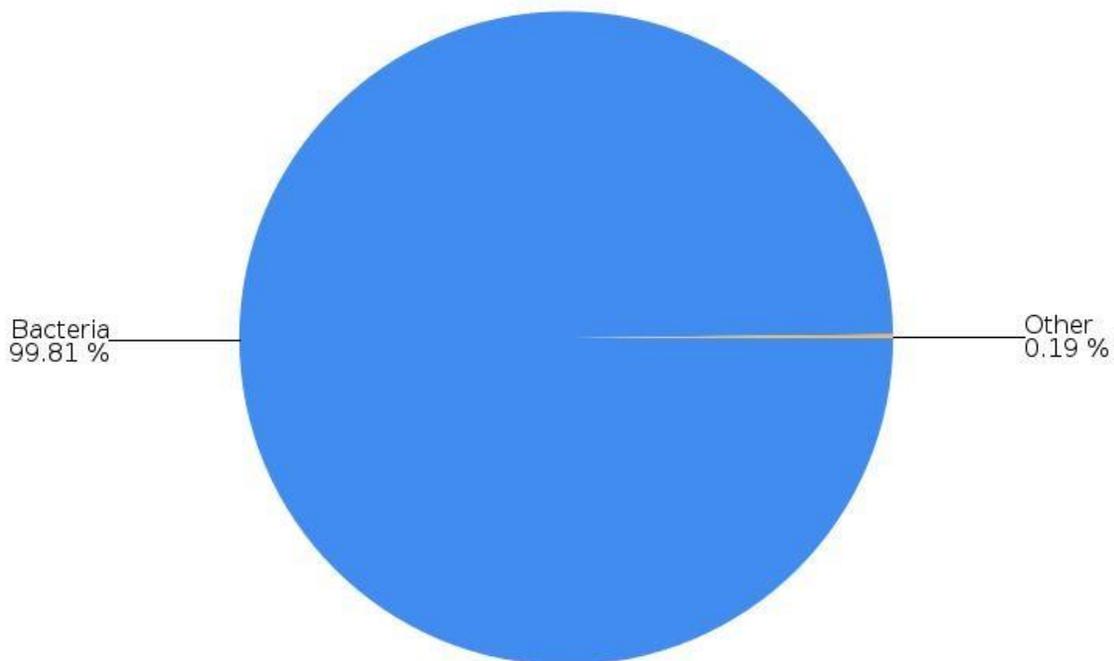
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

110 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	79,992	99.81 %
Unclassified at Kingdom level	149	0.19 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



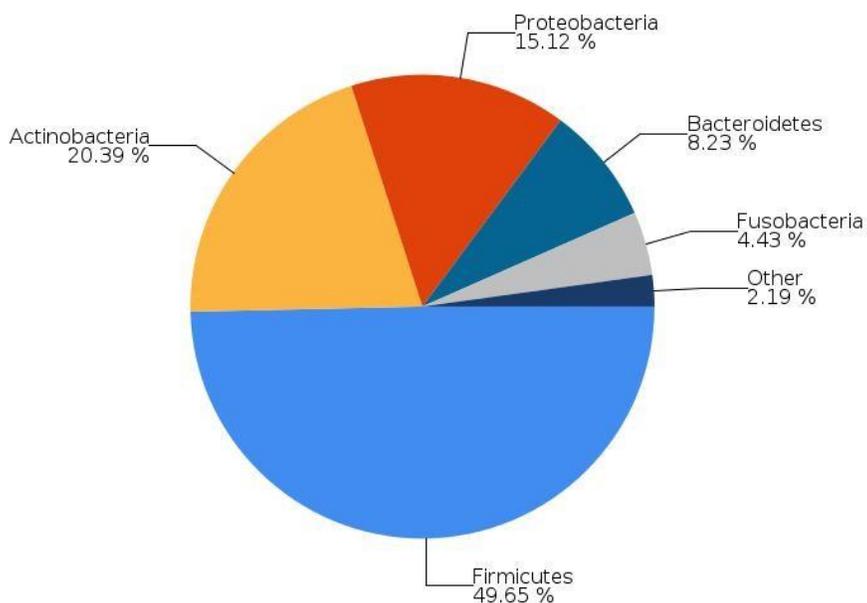
111 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	39,790	49.65 %
Actinobacteria	16,340	20.39 %
Proteobacteria	12,115	15.12 %
Bacteroidetes	6,592	8.23 %
Fusobacteria	3,552	4.43 %
Unclassified at Phylum level	1,583	1.98 %
Cyanobacteria	63	0.08 %
Thermi	26	0.03 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 19. This table shows the top 8 of 19 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



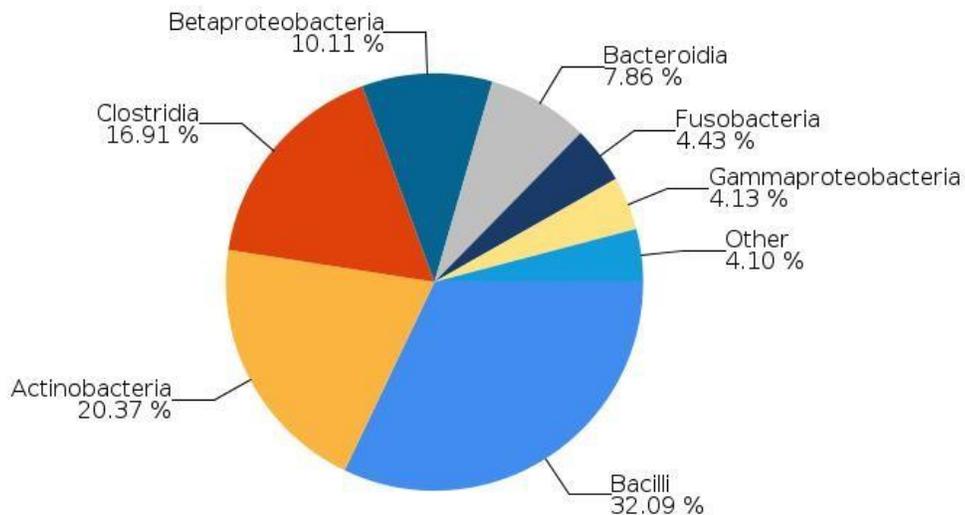
112 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	25,719	32.09 %
Actinobacteria	16,326	20.37 %
Clostridia	13,551	16.91 %
Betaproteobacteria	8,101	10.11 %
Bacteroidia	6,303	7.86 %
Fusobacteria	3,552	4.43 %
Gammaproteobacteria	3,306	4.13 %
Unclassified at Class level	2,532	3.16 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 33. This table shows the top 8 of 33 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results

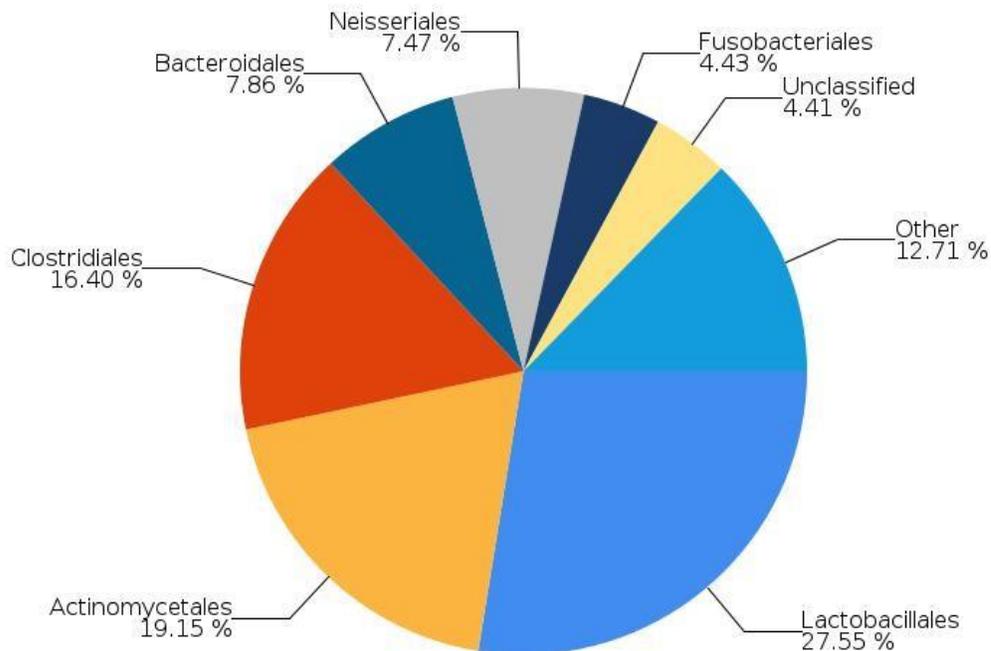


113 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	22,082	27.55 %
Actinomycetales	15,346	19.15 %
Clostridiales	13,145	16.40 %
Bacteroidales	6,303	7.86 %
Neisseriales	5,990	7.47 %
Fusobacteriales	3,552	4.43 %
Unclassified at Order level	3,538	4.41 %
Gemellales	2,779	3.47 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 73. This table shows the top 8 of 73 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results

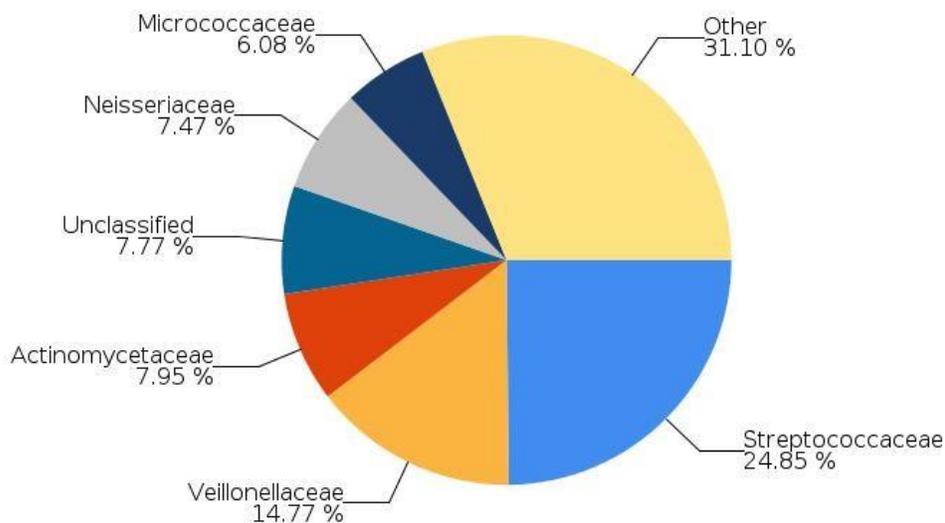


114 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	19,918	24.85 %
Veillonellaceae	11,835	14.77 %
Actinomycetaceae	6,375	7.95 %
Unclassified at Family level	6,230	7.77 %
Neisseriaceae	5,990	7.47 %
Micrococcaceae	4,872	6.08 %
Gemellaceae	2,779	3.47 %
Pasteurellaceae	2,767	3.45 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 152. This table shows the top 8 of 152 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



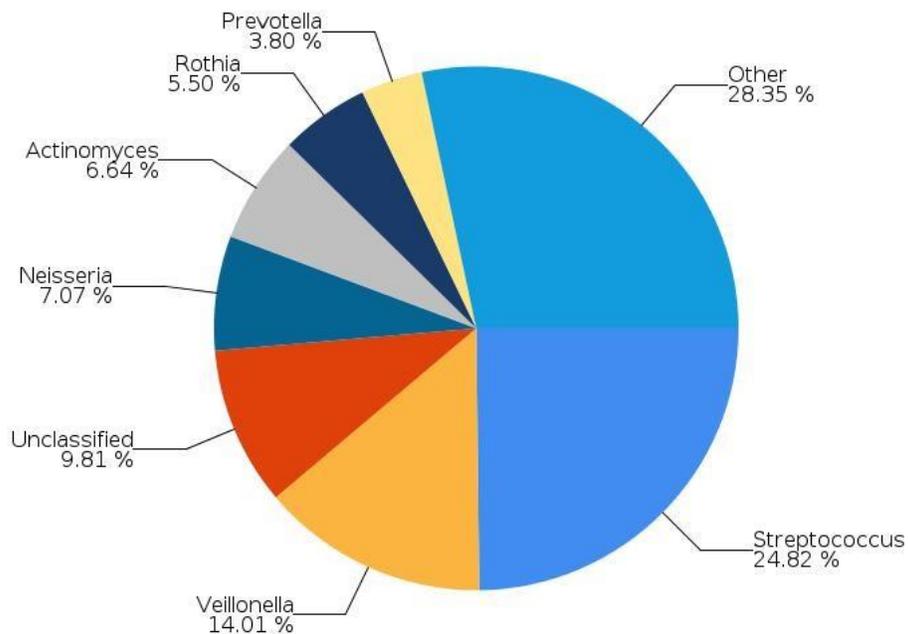
115 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	19,895	24.82 %
Veillonella	11,226	14.01 %
Unclassified at Genus level	7,861	9.81 %
Neisseria	5,663	7.07 %
Actinomyces	5,325	6.64 %
Rothia	4,410	5.50 %
Prevotella	3,043	3.80 %
Gemella	2,779	3.47 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 328. This table shows the top 8 of 328 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



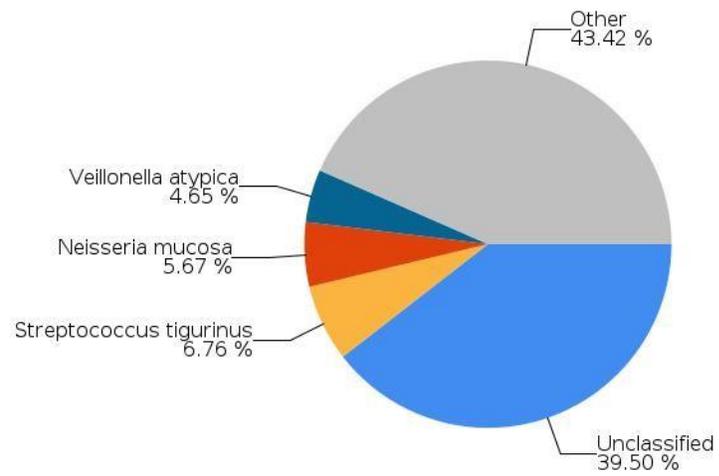
116 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	31,656	39.50 %
Streptococcus tigurinus	5,419	6.76 %
Neisseria mucosa	4,543	5.67 %
Veillonella atypica	3,727	4.65 %
Streptococcus vestibularis	2,629	3.28 %
Rothia mucilaginosa	2,263	2.82 %
Actinomyces meyeri	2,173	2.71 %
Lautropia mirabilis	1,725	2.15 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 466. This table shows the top 8 of 466 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-15

Report Date: 08/31/2018 18:17:24 (UTC)

Sample Configuration

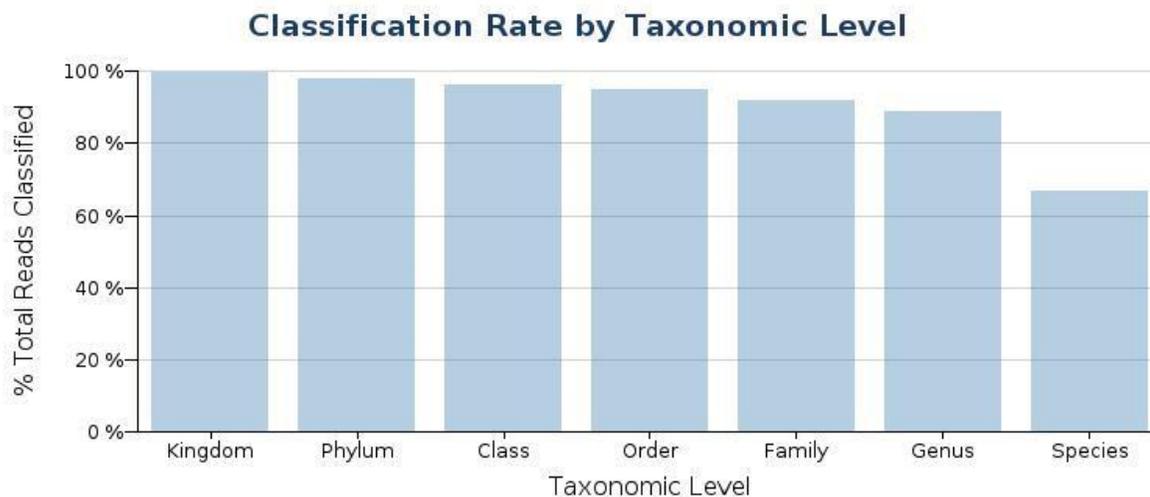
Sample ID:	15
Sample Name:	AI-15
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
82,457	82,457	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	82,344	99.86 %
Phylum	80,672	97.84 %
Class	79,235	96.09 %
Order	78,321	94.98 %
Family	75,925	92.08 %
Genus	73,165	88.73 %
Species	55,172	66.91 %



Classification Results by Taxonomic Level

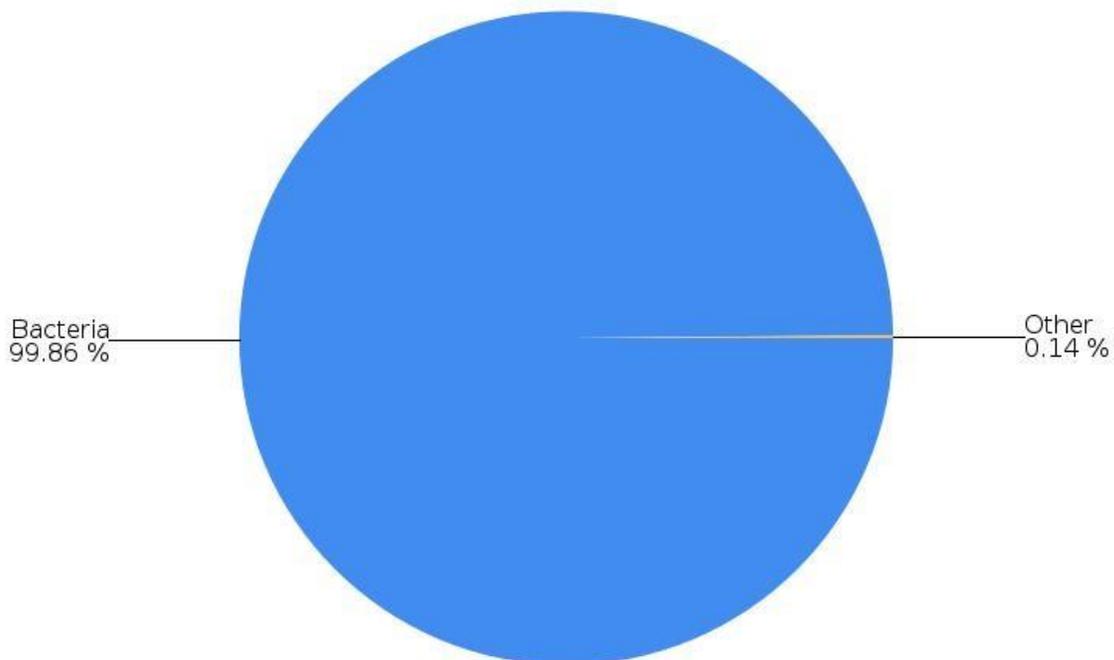
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

117 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	82,342	99.86 %
Unclassified at Kingdom level	113	0.14 %
Viruses	2	0.00 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results

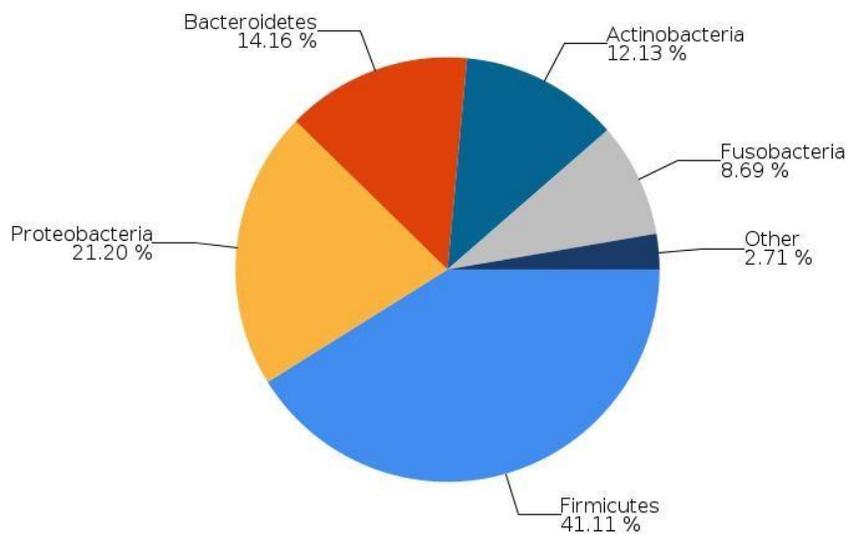


118 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	33,901	41.11 %
Proteobacteria	17,481	21.20 %
Bacteroidetes	11,679	14.16 %
Actinobacteria	10,001	12.13 %
Fusobacteria	7,162	8.69 %
Unclassified at Phylum level	1,785	2.16 %
Spirochaetes	207	0.25 %
Cyanobacteria	74	0.09 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 22. This table shows the top 8 of 22 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results

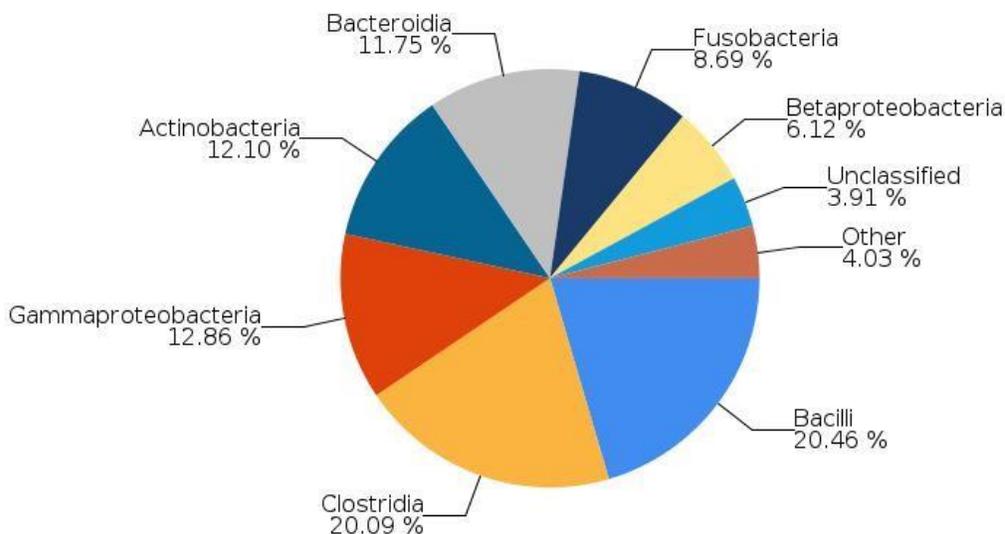


119 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	16,872	20.46 %
Clostridia	16,563	20.09 %
Gammaproteobacteria	10,602	12.86 %
Actinobacteria	9,981	12.10 %
Bacteroidia	9,685	11.75 %
Fusobacteria	7,162	8.69 %
Betaproteobacteria	5,050	6.12 %
Unclassified at Class level	3,222	3.91 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 38. This table shows the top 8 of 38 classifications. Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



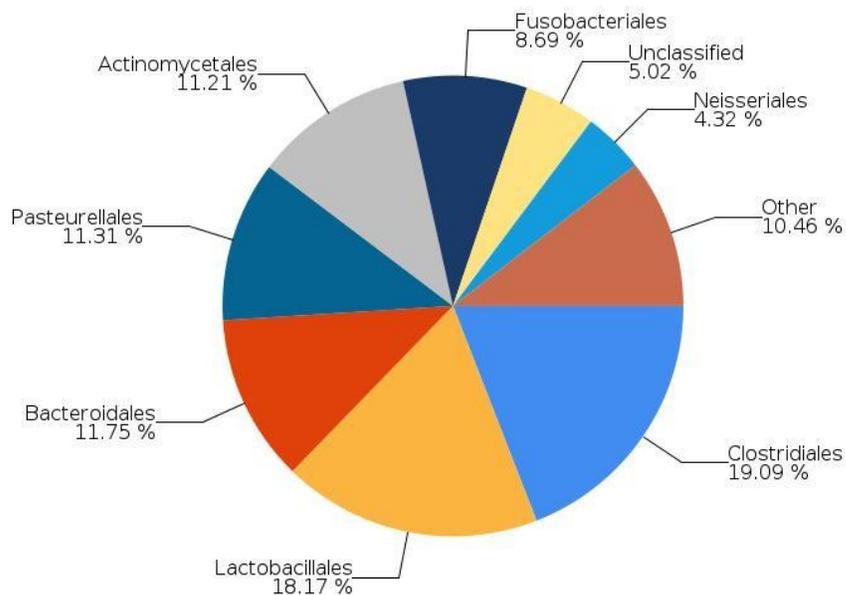
120 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Clostridiales	15,740	19.09 %
Lactobacillales	14,984	18.17 %
Bacteroidales	9,685	11.75 %
Pasteurellales	9,322	11.31 %
Actinomycetales	9,241	11.21 %
Fusobacteriales	7,162	8.69 %
Unclassified at Order level	4,136	5.02 %
Neisseriales	3,566	4.32 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 80. This table shows the top 8 of 80 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



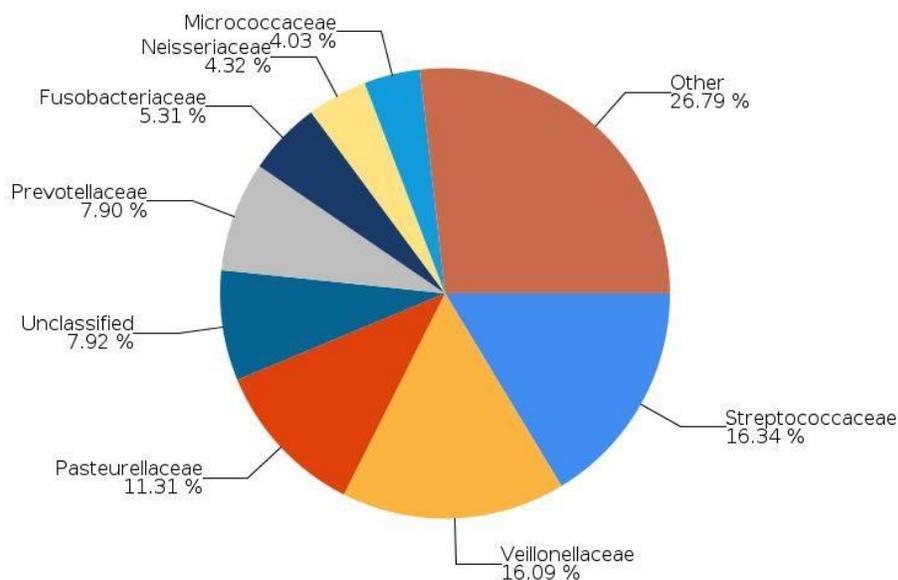
121 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	13,471	16.34 %
Veillonellaceae	13,264	16.09 %
Pasteurellaceae	9,322	11.31 %
Unclassified at Family level	6,532	7.92 %
Prevotellaceae	6,513	7.90 %
Fusobacteriaceae	4,377	5.31 %
Neisseriaceae	3,566	4.32 %
Micrococcaceae	3,323	4.03 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 174. This table shows the top 8 of 174 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



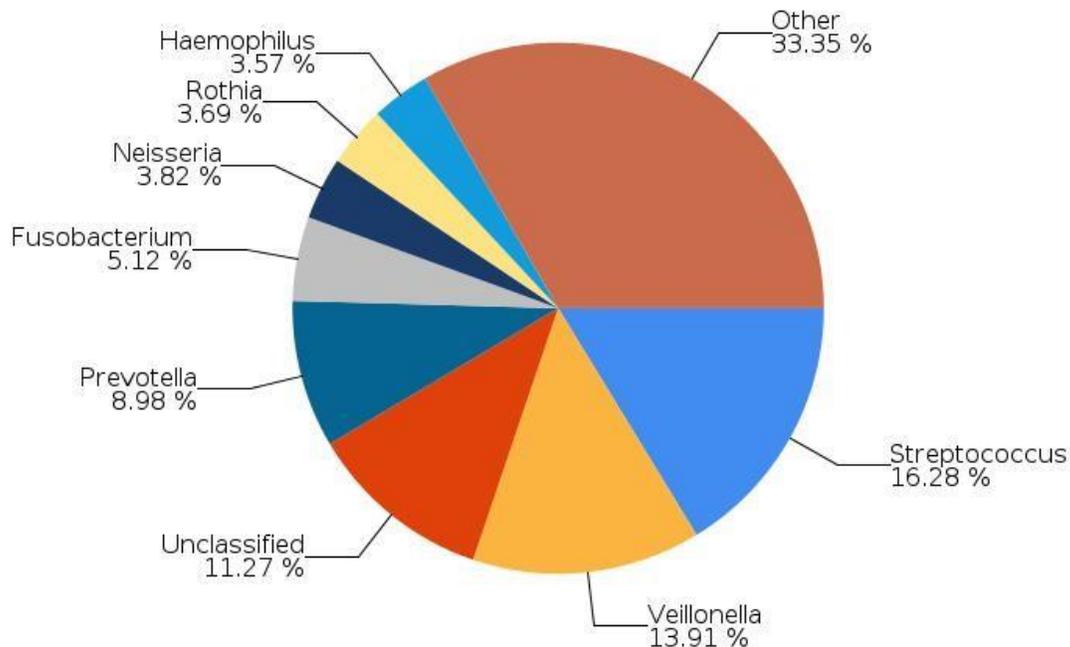
122 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	13,425	16.28 %
Veillonella	11,473	13.91 %
Unclassified at Genus level	9,292	11.27 %
Prevotella	7,406	8.98 %
Fusobacterium	4,218	5.12 %
Neisseria	3,150	3.82 %
Rothia	3,046	3.69 %
Haemophilus	2,944	3.57 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 355. This table shows the top 8 of 355 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



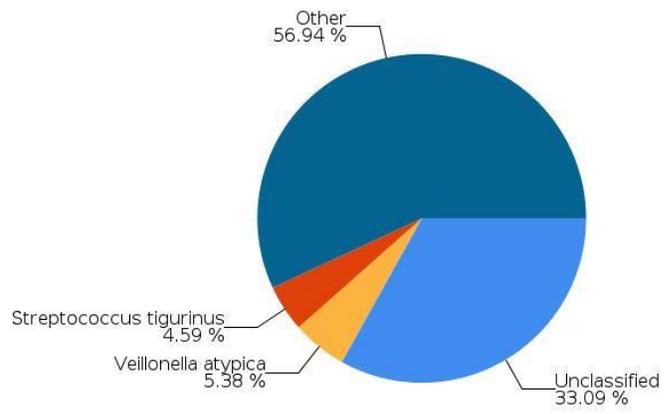
123 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	27,285	33.09 %
Veillonella atypica	4,438	5.38 %
Streptococcus tigurinus	3,787	4.59 %
Mannheimia caviae	2,444	2.96 %
Fusobacterium naviforme	2,186	2.65 %
Haemophilus parainfluenzae	1,902	2.31 %
Neisseria mucosa	1,819	2.21 %
Prevotella melaninogenica	1,276	1.55 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 515. This table shows the top 8 of 515 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results





16S Metagenomics Report

Sample: AI-16

Report Date: 08/31/2018 18:17:22 (UTC)

Sample Configuration

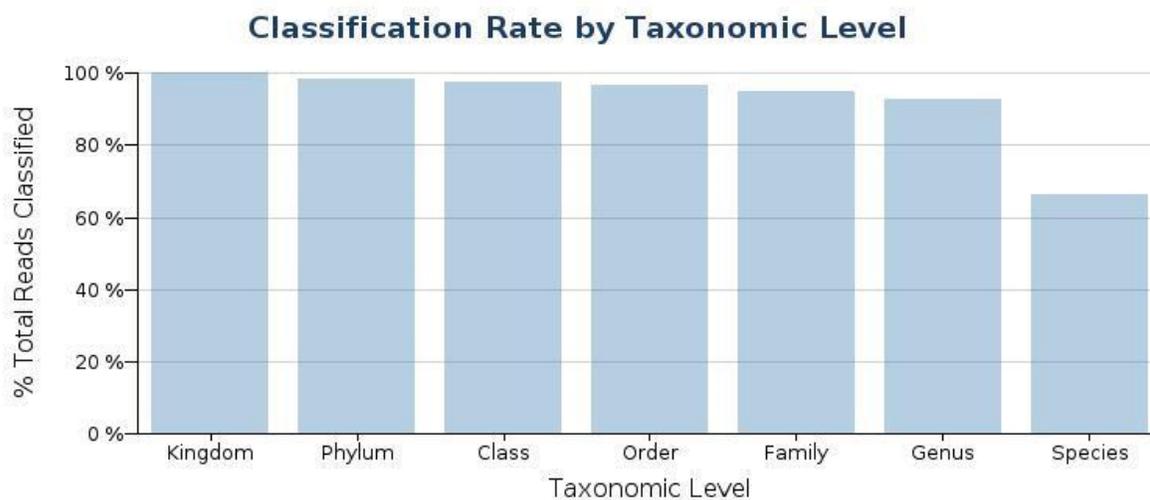
Sample ID:	16
Sample Name:	AI-16
Run Folder:	/data/scratch/workspace/RunFolder
Taxonomy File:	gg_13_5_species_32bp.dat

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
75,581	75,581	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	75,526	99.93 %
Phylum	74,505	98.58 %
Class	73,598	97.38 %
Order	73,081	96.69 %
Family	71,615	94.75 %
Genus	70,088	92.73 %
Species	50,212	66.43 %



Classification Results by Taxonomic Level

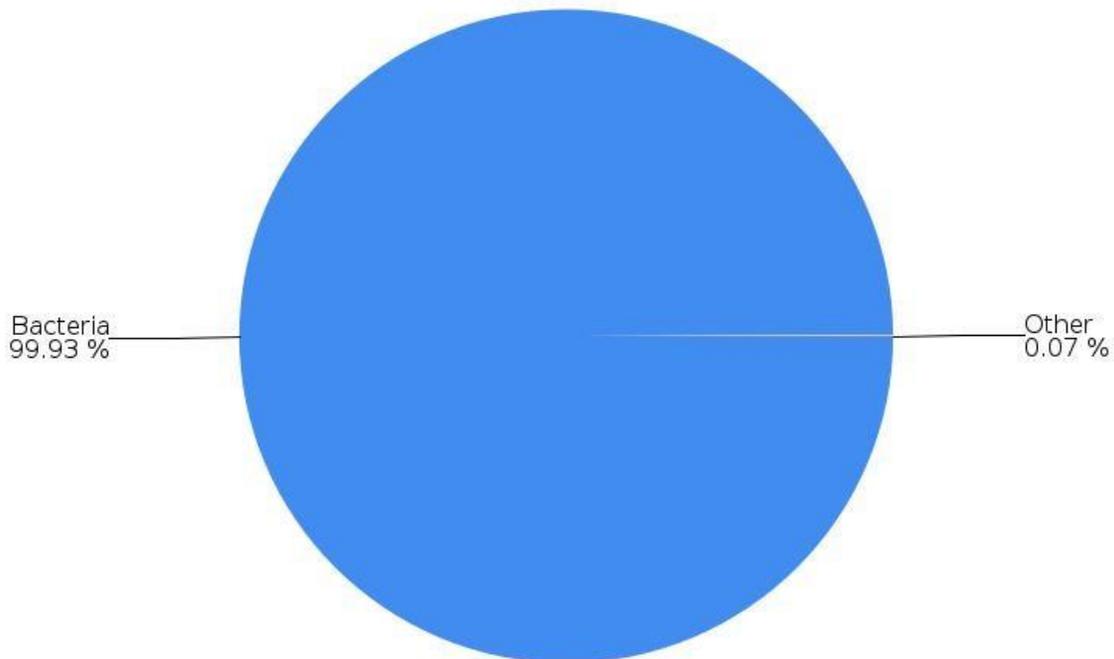
Tables show the highest 8 taxonomic classifications at each level. Pie charts show all classifications above 3.5% abundance.

124 Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	75,526	99.93 %
Unclassified at Kingdom level	55	0.07 %

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Kingdom Classification Results



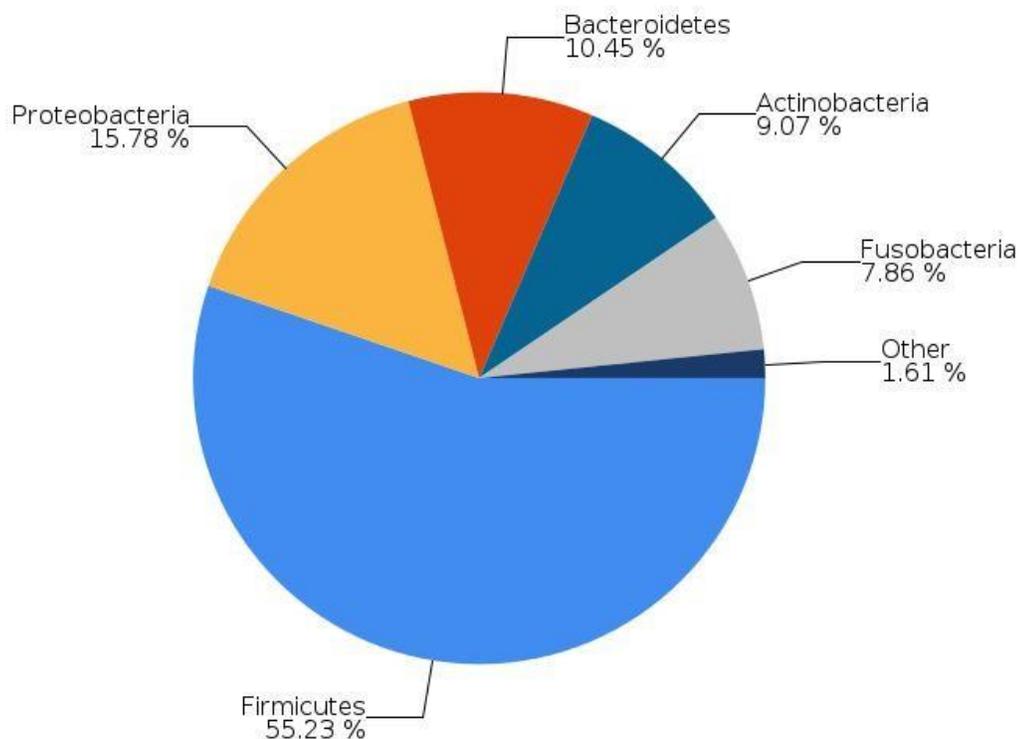
125 Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	41,746	55.23 %
Proteobacteria	11,925	15.78 %
Bacteroidetes	7,897	10.45 %
Actinobacteria	6,853	9.07 %
Fusobacteria	5,940	7.86 %
Unclassified at Phylum level	1,076	1.42 %
Cyanobacteria	51	0.07 %
Thermotogae	30	0.04 %

Total Phylum-level Taxonomic Categories Identified: 17. This table shows the top 8 of 17 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Phylum Classification Results



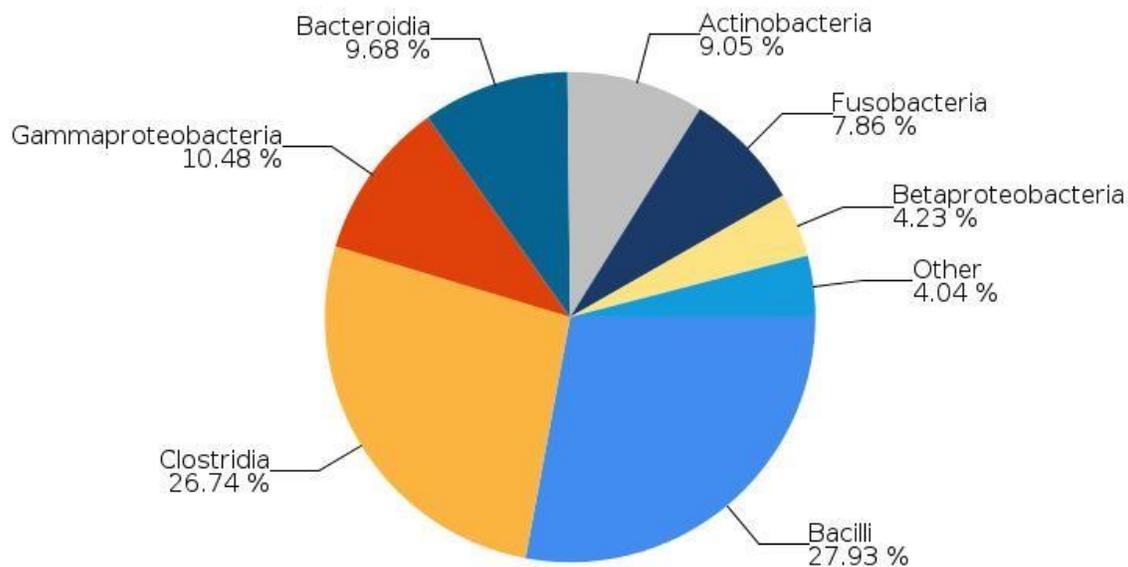
126 Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	21,106	27.93 %
Clostridia	20,207	26.74 %
Gammaproteobacteria	7,920	10.48 %
Bacteroidia	7,319	9.68 %
Actinobacteria	6,842	9.05 %
Fusobacteria	5,940	7.86 %
Betaproteobacteria	3,194	4.23 %
Unclassified at Class level	1,983	2.62 %

Total Class-level Taxonomic Categories Identified: 32. This table shows the top 8 of 32 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Class Classification Results



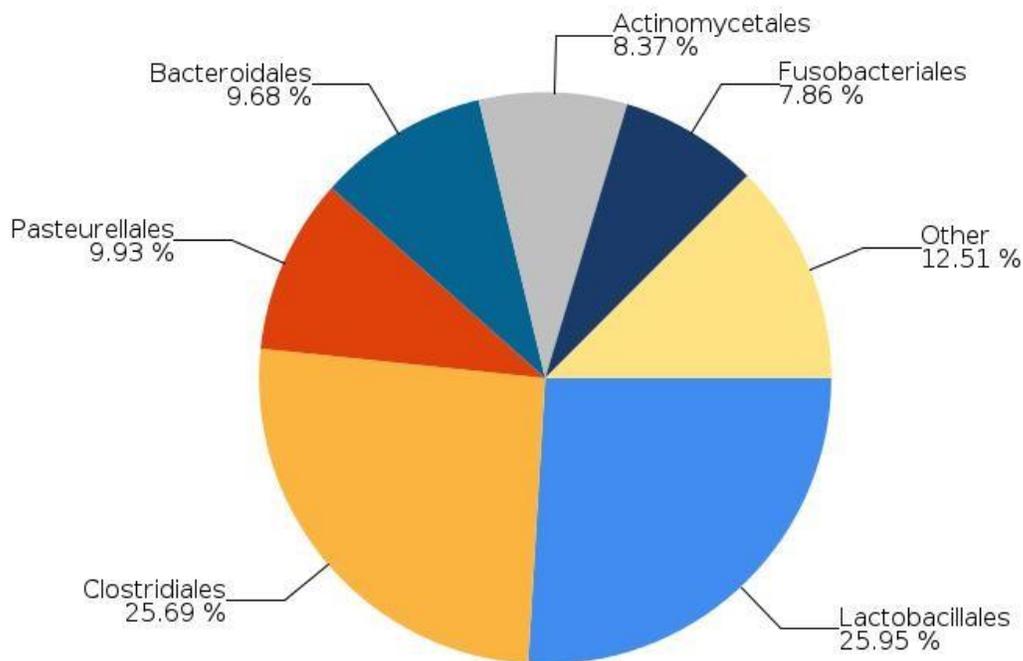
127 Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	19,616	25.95 %
Clostridiales	19,419	25.69 %
Pasteurellales	7,504	9.93 %
Bacteroidales	7,319	9.68 %
Actinomycetales	6,329	8.37 %
Fusobacteriales	5,940	7.86 %
Unclassified at Order level	2,500	3.31 %
Neisseriales	1,995	2.64 %

Total Order-level Taxonomic Categories Identified: 71. This table shows the top 8 of 71 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Order Classification Results



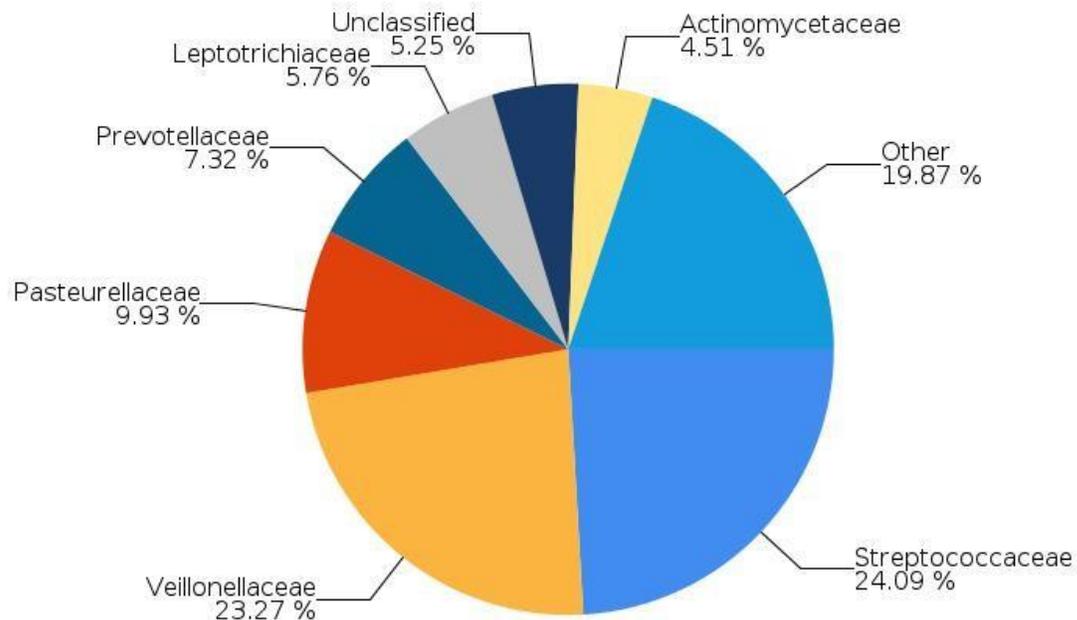
128 Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcaceae	18,211	24.09 %
Veillonellaceae	17,585	23.27 %
Pasteurellaceae	7,504	9.93 %
Prevotellaceae	5,533	7.32 %
Leptotrichiaceae	4,354	5.76 %
Unclassified at Family level	3,966	5.25 %
Actinomycetaceae	3,411	4.51 %
Neisseriaceae	1,995	2.64 %

Total Family-level Taxonomic Categories Identified: 158. This table shows the top 8 of 158 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Family Classification Results



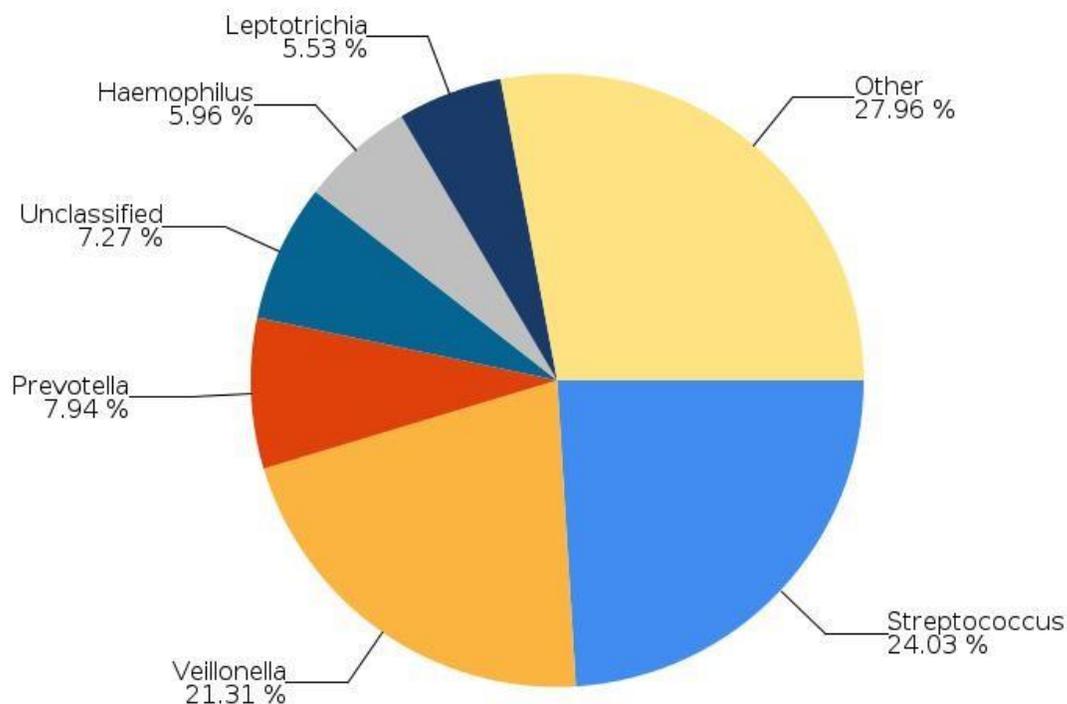
129 Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Streptococcus	18,165	24.03 %
Veillonella	16,109	21.31 %
Prevotella	5,998	7.94 %
Unclassified at Genus level	5,493	7.27 %
Haemophilus	4,504	5.96 %
Leptotrichia	4,181	5.53 %
Actinomyces	2,321	3.07 %
Neisseria	1,843	2.44 %

Total Genus-level Taxonomic Categories Identified: 304. This table shows the top 8 of 304 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Genus Classification Results



130 Top Species Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Species level	25,369	33.57 %
Streptococcus tigurinus	5,832	7.72 %
Veillonella atypica	4,808	6.36 %
Veillonella dispar	3,360	4.45 %
Leptotrichia hofstadii	2,519	3.33 %
Veillonella montpellierensis	1,982	2.62 %
Streptococcus pseudopneumoniae	1,660	2.20 %
Haemophilus parainfluenzae	1,629	2.16 %

Total Species-level Taxonomic Categories Identified: 417. This table shows the top 8 of 417 classifications.

Note: The "Other" category in this pie chart is the sum of all classifications with less than 3.50 % abundance.

Top Species Classification Results

