

Estudio piloto comparativo de las diferencias cualitativas del *biofilm* dental entre dientes con hipomineralización incisivo molar y sus homólogos sanos

MIGUEL HERNÁNDEZ¹, MIGUEL CARDA², ÁLEX MIRA²

¹Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona. Barcelona. ²Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO). Valencia

RESUMEN

Introducción: describimos por primera vez la microbiota asociada a la hipomineralización incisivo-molar (HIM).

Método: se tomaron muestras de *biofilm* supragingival de dientes sanos y afectados de 25 niños con HIM. Se extrajo el ADN total y se secuenció el gen 16S rRNA para describir la composición bacteriana.

Resultados: detectamos una mayor diversidad bacteriana en muestras de HIM, lo que sugiere una mejor adhesión bacteriana o un mayor número de nichos en esas superficies.

Conclusión: el mayor contenido de proteínas de los dientes afectados por HIM podría favorecer la colonización por microorganismos proteolíticos. La sobrerepresentación de bacterias asociadas con infecciones endodóncicas y patologías periodontales sugiere que el HIM podría aumentar el riesgo de otras enfermedades orales.

PALABRAS CLAVE: Hipomineralización incisivo-molar. Desmineralización. Microbiología. Caries. Ecología microbiana.

ABSTRACT

Introduction: we describe for the first time the microbiota associated with molar-incisor hypomineralization (MIH).

Method: supragingival biofilm samples were taken from healthy and affected teeth of 25 children with MIH. Total DNA was extracted and the 16S rRNA gene was sequenced to describe the bacterial composition.

Results: we detected greater bacterial diversity in the MIH samples, which suggests better bacterial adhesion or a greater number of niches on these surfaces.

Conclusion: the higher protein content of the teeth affected by MIH could favor colonization by proteolytic microorganisms. Overrepresentation of bacteria associated with endodontic infections and periodontal pathologies suggests that MIH may increase the risk of other oral diseases.

KEYWORDS: Molar-incisor hypomineralization. Demineralization. Microbiology. Caries. Microbial ecology.

INTRODUCCIÓN

El término “hipomineralización incisivo-molar” propuesto por Weerheijm (1) fue aceptado durante la reunión de la Academia Europea de Odontología Pediátrica celebrada en Atenas en 2003 para definir una “hipomineralización de origen sistémico y etiología desconocida que afecta de uno a

Recibido: 14/09/2020 • Aceptado: 15/09/2020

Hernández M, Carda M, Mira Á. Estudio piloto comparativo de las diferencias cualitativas del *biofilm* dental entre dientes con hipomineralización incisivo molar y sus homólogos sanos. *Odontol Pediatr* 2020;28(3):133-142

cuatro primeros molares permanentes frecuentemente asociados con incisivos permanentes afectados” (2). La HIM aparece como opacidades asimétricas de color blanco, crema, amarillo o marrón en la cúspide o el tercio incisal de la corona de los dientes afectados, que varían en extensión y gravedad (3).

Las comunidades bacterianas en la cavidad oral se han estudiado profundamente desde que las tecnologías de secuenciación estuvieron disponibles (4,5) constatando que la microbiota oral tiene un papel esencial en la salud oral (6). En la actualidad, se han establecido las microbiotas comensales y patógenas asociadas con varias enfermedades, incluidas la caries y la periodontitis (7); sin embargo, todavía hay algunas condiciones orales en las que no se ha evaluado una asociación bacteriana y este es el caso de la HIM.

Los trastornos que surgen durante la etapa secretora de la matriz inicial en el proceso de amelogenesis pueden conducir a defectos estructurales cuantitativos que se manifiestan como hipoplasia dental, mientras que los que afectan las etapas de maduración o mineralización conducen a hipomineralización o defectos cualitativos (8).

En general, la HIM se desarrolla durante los primeros tres años de vida cuando tiene lugar el proceso de mineralización de las coronas de los primeros molares permanentes (PMP) y de los incisivos permanentes (9,10). Su prevalencia depende principalmente del país examinado, habiéndose informado cifras que van del 2,8 % al 44 % (11). En particular, los países con ingresos bajos y medios y los niños con mala salud general durante los primeros tres años de vida tienen más probabilidades de sufrir HIM (12,13).

La condición de HIM puede conducir a problemas graves como hipersensibilidad y dolor, colapso pos eruptivo, problemas de masticación y alimentación, problemas estéticos y dificultades de tratamiento. Además, los malos resultados restaurativos y terapéuticos hacen que la HIM sea una condición desafiante para pacientes, cuidadores y dentistas (14).

Aunque se ha encontrado que la HIM se asocia supuestamente con exposiciones prenatales a posibles factores de riesgo, la explicación más plausible es que se trate de una patogenia multifactorial con un posible componente genético (15). Se cree que el origen del problema es una alteración en la capacidad de reabsorción de la matriz orgánica y la inhibición de las enzimas proteolíticas por lo que se acumularían proteínas, reduciendo el espacio para depositar los minerales (10), lo que resultaría en un esmalte poroso (16). De hecho, el esmalte afectado por HIM muestra un contenido de proteínas de 3 a 21 veces mayor y menor dureza y elasticidad que los dientes normales (17). En consecuencia, la modificación estructural de la superficie del esmalte crea diferentes nichos para la colonización bacteriana aumentando el riesgo general de caries.

Sin embargo, no hay estudios en los que se hayan analizado las comunidades bacterianas en la placa dental de las superficies con HIM. Debido a los hallazgos anteriores sobre el papel que las bacterias orales pueden tener en la destrucción de los dientes y las encías dependiendo de la composición del tejido (7,18), y el aumento de la concentración de pro-

teínas en los dientes con HIM, planteamos la hipótesis que las bacterias proteolíticas o cariogénicas podrían favorecerse significativamente en los dientes afectados por HIM. Para probar eso, se determinó la composición bacteriana y la diversidad de los dientes con HIM mediante secuenciación de alto rendimiento de ADN y se comparó con dientes sanos en los mismos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTREO

El procedimiento para tomar muestras de la placa dental supragingival de pacientes con HIM fue aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Barcelona (ref. IRB00003099). En este estudio piloto, se seleccionaron al azar 25 niños de un grupo de 87 niños con HIM de edades comprendidas entre 6 y 12 años. Si el azar nos llevó a un niño con los 4 PMP afectados, saltábamos el turno y seguíamos hasta el próximo niño que tuviera algún PMP sano que pudiera actuar como control. Todos los dientes con HIM seleccionados tenían el mismo grado de afectación (opacidades amarillas/marrones en la cara vestibular sin colapso pos eruptivo o restauraciones atípicas en el resto del diente). Ningún niño seleccionado mostró sensibilidad al cepillarse los dientes con agua templada; aproximadamente, entre 39 y 41 grados centígrados.

Los padres/tutores de los participantes fueron informados sobre el estudio y firmaron un documento de consentimiento informado. Se tomaron, también, datos clínicos de la presencia de asma, dermatitis atópica y alergias alimentarias ya que, recientemente, se había informado de la relación existente entre la dermatitis atópica y las alergias alimentarias (19) y queríamos ver si la presencia de los componentes de la marcha alérgica se relacionaba con alguna alteración de la microbiota oral en estos pacientes.

En cuanto a las medidas preventivas, tanto en la consulta como en casa, 23 individuos recibían fluoruro, una o dos veces al día, en pasta de dientes a una concentración de 1450 ppm; 11 niños recibían fluoruro a una concentración de 5000 ppm y 226000 ppm en el cepillado nocturno y cada seis meses, respectivamente. Dos participantes no recibían ningún tipo de producto fluorado por decisión de los tutores legales.

Se pidió a los pacientes que se cepillaran los dientes la noche anterior después de cenar, pero no por la mañana para obtener una placa dental supragingival de 12 h de grado de maduración similar entre los donantes. Cada muestra se recogió con un excavador estéril diferente sin haber secado los dientes antes de obtener las dos muestras de cada paciente; una muestra de un diente afecto de HIM y la otra de su contralateral (control saludable). El área muestreada fue similar tanto en el control como en los dientes afectados por HIM. El material recogido se colocó en un tubo de microcentrifuga con 500 μ l de solución de conservación de ADN Isohelix (Cell Projects Ltd, Kent, Reino Unido) a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rRNA

Las muestras se extrajeron utilizando el kit de aislamiento de ADN MagNa Pure LC II (Roche®). El protocolo se usó según lo indicado por la compañía con algunas modificaciones según Dzidic y cols. (20).

Usando el protocolo de Illumina se preparó la biblioteca de secuenciación metagenómica en el servicio de secuenciación en la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO). Los datos se depositaron en la base de datos SRA (Bioproyecto PRJNA542627: Microbiología de las lesiones de hipomineralización molar-incisiva, SRR9098974-SRR9099019).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las curvas de rarefacción, mapas de calor, análisis de componentes principales (PCoA), análisis de correlación canónica (CCA) y pruebas estadísticas de suma de rangos de Wilcoxon se realizaron utilizando los paquetes Vegan (21) y ade4 (22). Cuando se realizaron comparaciones múltiples, los valores de p fueron corregidos por la corrección de Bonferroni. Se evaluaron las pruebas estadísticas comparando la muestra de HIM de cada paciente contra su propia muestra sana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este es, según nuestro conocimiento, el primer estudio de las comunidades microbianas asociadas con la HIM. Hemos secuenciado el gen 16S rRNA de las bacterias residentes en los dientes usando Illumina MiSeq para describir los microorganismos asociados con defectos de mineralización de 25 pacientes y compararlo con dientes sanos equivalentes de los mismos individuos.

Dos niños fueron excluidos del estudio porque no pudimos obtener suficiente material de placa. Los 23 niños restantes

tenían una edad similar de $9 \pm 1,9$ años y un grado de afectación parecido. Por tanto, no consideramos que estos dos factores agregaran una variación significativa a los resultados observados.

Según su historial médico, 10 individuos (7 niñas y 3 niños) tenían dermatitis atópica; 3 niños (2 niños y una niña) presentaron alergias alimentarias; 3 niños tenían asma y dos niñas tenían enfermedad celíaca.

DIVERSIDAD MICROBIANA EN SITIOS HIPOMINERALIZADOS

Curiosamente, cuando se agruparon todas las muestras de cada categoría (dientes sanos o hipomineralizados), analizando la diversidad y la riqueza bacteriana de la microbiota asociada, las curvas de rarefacción (relacionan el esfuerzo de secuenciación con el número estimado de especies) obtenidas para cada grupo correspondiente a las muestras de HIM mostraron una mayor diversidad microbiana que los dientes no afectados o dientes control (Fig. 1). Además, los índices de diversidad y riqueza de Shannon, Chao1 y ACE respaldaron este resultado (Tabla I). Por lo general, cuando se comparan microbiotas de un estado saludable y un estado disbiótico, se encuentra una mayor diversidad en muestras sanas, como ocurre cuando se comparan superficies de dientes sanas con lesiones de caries de esmalte o dentina (18).

TABLA I.
COMPARACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A DIENTES SANOS Y CON HIM. ÍNDICES DE DIVERSIDAD Y RIQUEZA A NIVEL DE ESPECIE PARA LOS DOS GRUPOS, CALCULADOS PARA 20.000 LECTURAS DE CADA MUESTRA

Index	Hipo	Control
n	204,17	180,83
Shannon	4,36	4,11
Chao1 ± SE	208,14 ± 4	184,08 ± 3
ACE ± SE	207,02 ± 5	183,08 ± 5

n: número de especies (OTUs); SE: error estándar.

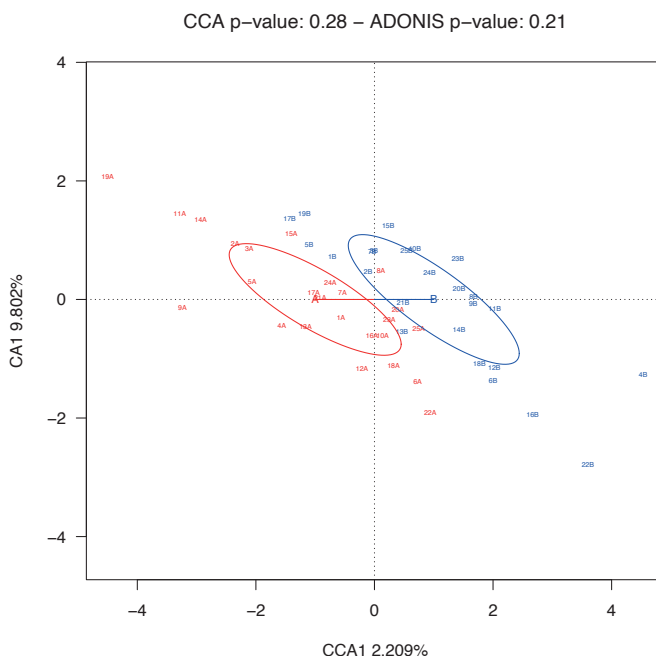


Fig. 1. Comparación de las comunidades bacterianas asociadas a dientes sanos y con HIM. Análisis de la diversidad bacteriana de la microbiota asociada a dientes sanos (azul) frente a dientes hipomineralizados (marrón). Análisis de correspondencia canónica (CCA) que revela cómo se agrupan las muestras de los dientes sanos e hipomineralizados según el análisis de componentes principales realizado en todas las muestras y basado en la abundancia relativa de cada género bacteriano.

En algunas ocasiones, se ha observado lo contrario, como en bolsas periodontales frente a surcos gingivales sanos (23). Esto se ha relacionado con una mayor disponibilidad de nutrientes o un sistema inmunitario deteriorado en los sitios afectados, lo que facilitaría la colonización microbiana (7). En el caso informado en el manuscrito actual, planteamos la hipótesis de que la degradación del esmalte afectaría la porosidad y, por lo tanto, aumentaría la superficie adherible en el diente y, como consecuencia, aumentaría el número de bacterias unidas y, por lo tanto, la diversidad.

Además, el mayor contenido de proteínas en las lesiones de HIM también podría favorecer una comunidad microbiana más grande o más diversa, particularmente los organismos proteolíticos. También debe considerarse la posibilidad de que la hipersensibilidad en los dientes con HIM haga que los pacientes se cepillen los dientes afectados por HIM más suavemente o con menos frecuencia que los dientes no afectados, y este hecho podría dar lugar a una acumulación desigual de placa.

COMPOSICIÓN MICROBIANA EN SITIOS HIPOMINERALIZADOS

Los análisis de la composición microbiana a nivel de género mostraron diferencias menores entre las regiones con hipomineralización y las zonas de control (Fig. 2). En ambos casos, encontramos una microbiota muy diversa en la que

Streptococcus (12 %) y *Leptotrichia* (10 %) fueron los géneros más abundantes, mientras que *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Porphyromonas* y *Saccharimonadaceae* alcanzaron porcentajes similares (2-5 %), llegando al 70 % de la población en ambos escenarios.

Para desentrañar el origen de estas diferencias, agrupamos las muestras de HIM de acuerdo con varias características de los pacientes: dermatitis atópica, alergias alimentarias o asma (19); si fueron tratados con fluoruro o la cantidad de dientes afectados. Solo cuando las muestras se clasificaron en dos grupos según el número de dientes hipomineralizados (≤ 3 [bajo] o ≥ 4 [alto]), el agrupamiento fue significativo ($p = 0,04$). Esto sugirió que el grado de afectación influyó en la composición microbiana, pero no hubo correlación entre la composición bacteriana y las otras características estudiadas del historial médico de los pacientes.

Colombo y cols. (24) detectaron una prevalencia significativa de *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Lautropia*, *Veillonella* y *Rothia* en pacientes con éxito terapéutico periodontal, todos los cuales fueron más abundantes en nuestras muestras de control. Además, encontramos otros ejemplos de estudios que asociaron la periodontitis con las especies relacionadas con hipomineralización. Por ejemplo, *Centipeda periodontii* se ha asociado con periodontitis en pacientes taiwaneses (25). Siqueira y Roças (26) encontraron *Catonella morbi* en el 33 % de los conductos radiculares en la periodontitis

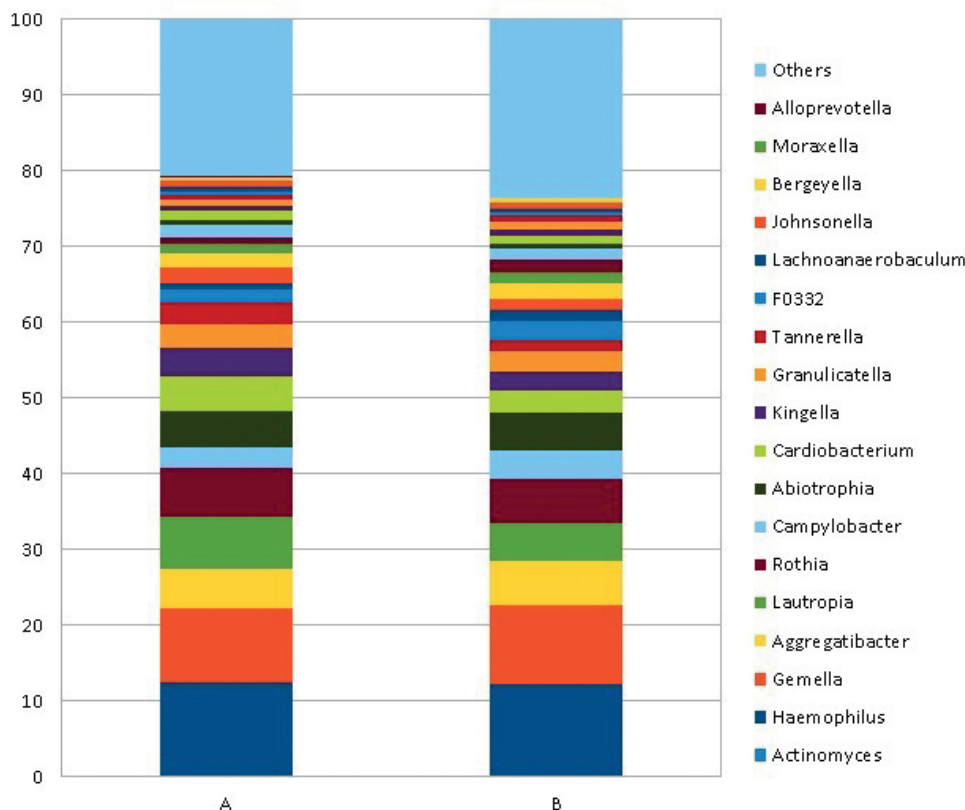


Fig. 2. Comparación de comunidades bacterianas asociadas a dientes sanos (A) e hipomineralizados (B). Mediana de los géneros bacterianos más abundantes según lo determinado por la secuenciación Illumina del gen 16S rRNA.

apical crónica y en el 26 % de las infecciones endodónticas primarias al amplificar el gen 16S rRNA. Finalmente, en dos estudios que usaron tecnologías de secuenciación de próxima generación en las que se comparó la microbiota de pacientes sanos y de pacientes con periodontitis, se detectó una abundancia significativa de *Catonella* en los afectados (27,28).

Además, *Campylobacter*, *Centipeda*, *Alloprevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* y *Catonella* formaron parte de los 17 taxones (los taxones son un grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción si es una especie, y un tipo) significativamente enriquecidos en las muestras orales de pacientes con cáncer oral (29). En este mismo estudio, Zhao y cols. (29) encontraron *Lautropia*, *Veillonella*, *Rothia* y *Actinomyces* asociados con los controles. Hay que tener en cuenta que la mayoría de las especies bacterianas asociadas con lesiones hipomineralizadas eran altamente proteolíticas, lo que sugiere que el mayor contenido de proteínas en esos sitios puede favorecer el crecimiento de estas bacterias, que están asociadas con diversas enfermedades orales y sistémicas.

En conclusión, aunque las diferencias entre dientes sanos e hipomineralizados son pequeñas, hay algunos taxones que parecen estar significativamente asociados con cada situación. Aunque no tenemos muestras de individuos sanos en nuestro estudio, las diferencias detectadas según la gravedad de la enfermedad sugieren que la HIM puede seleccionar bacterias asociadas a la enfermedad y que, contrariamente a nuestras expectativas, no son sacarolíticas y estaban relacionadas con el riesgo de caries. Además, la mayoría de los taxones que se encuentran en este estudio asociados con dientes hipomineralizados se han relacionado previamente con otras enfermedades orales.

Esto sugiere que la HIM podría estar relacionada, no solo, con la progresión de la caries debido a un contenido mineral reducido sino también a un mayor riesgo de enfermedades periodontales debido a los niveles más altos de bacterias asociadas con esta afección. Por lo tanto, sugerimos que las investigaciones futuras, especialmente los estudios longitudinales, deberían investigar si las comunidades patógenas asociadas a HIM pueden aumentar el riesgo de otras enfermedades orales y sistémicas que están influenciadas por microorganismos proteolíticos. Además, otros estudios deberían aclarar si la comunidad patógena asociada con los dientes con HIM es solo una consecuencia de la enfermedad o si puede contribuir a su progresión. Por ejemplo, las bacterias proteolíticas detectadas en el manuscrito actual podrían degradar el alto contenido de proteínas de los dientes afectados por HIM, facilitando la invasión microbiana de los túbulos dentinarios, que se ha demostrado mediante microscopía electrónica (30), y contribuir a la cavitación e hipersensibilidad.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación pudo llevarse a cabo gracias al apoyo financiero de la I Beca de Investigación otorgada por la Sociedad Española de Odontopediatría.

CORRESPONDENCIA:

Miguel Hernández
Departamento de Odontostomatología
Facultad de Odontología
Universidad de Barcelona
C/ Feixa Llarga s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona
e-mail: m_hernandez_j@ub.edu

BIBLIOGRAFÍA

- Weerheijm KL, Groen HJ, Beentjes VE, Poorterman JH. Prevalence of cheese molars in eleven-year-old Dutch children. *ASDC J Dent Child* 2001; 68(4):259-62, 229.
- Weerheijm KL, Duggal M, Mejäre I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, et al. Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *Eur J Paediatr Dent* 2003;4(3):110-3.
- Mathu-Muju K, Wright JT. Diagnosis and treatment of molar incisor hypomineralization. *Compend Contin Educ Dent* 2006; 27(11):604-10; quiz 611.
- Jia G, Zhi A, Lai PFH, Wang G, Xia Y, Xiong Z, et al. The oral microbiota - a mechanistic role for systemic diseases. *Br Dent J* 2018; 224(6):447-55. DOI: 10.1038/sj.bdj.2018.217
- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(12):745-59. DOI: 10.1038/s41579-018-0089-x
- Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother* 2018;99:883-93. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.146
- Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol* 2017;44(Suppl. 1):S23-S38. DOI: 10.1111/jcpe.12671
- Elcock C, Smith RN, Simpson J, Abdellatif A, Bäckman B, Brook AH. Comparison of methods for measurement of hypoplastic lesions. *Eur J Oral Sci* 2006;114(Suppl.):365-9; discussion 375-6, 382-3. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2006.00316.x
- Weerheijm KL, Jälevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries Res* 2001;35(5):390-1. DOI: 10.1159/000047479
- Hernández M, Boj J-R, Espasa E, Peretz B. First Permanent Molars and Permanent Incisors Teeth by Tooth Prevalence of Molar-Incisor-Hypomineralisation in a Group of Spanish Schoolchildren. *Acta Stomatol Croat* 2018;52(1):4-11. DOI: 10.15644/asc52/1/1
- Hernández M, Boj JR, Espasa E. Do We Really Know the Prevalence of MIH? *J Clin Pediatr Dent* 2016;40(4):259-63. DOI: 10.17796/1053-4628-40.4.259
- Alaluusua S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010;11(2):53-8.
- Schwendicke F, Elhennawy K, Reda S, Bekes K, Manton DJ, Krois J. Global burden of molar incisor hypomineralization. *J Dent* 2018;68:10-8. DOI: 10.1016/j.jdent.2017.12.002
- Elhennawy K, Schwendicke F. Managing molar-incisor hypomineralization: A systematic review. *J Dent* 2016;55:16-24. DOI: 10.1016/j.jdent.2016.09.012
- Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. Etiology of molar incisor hypomineralization - A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol* 2016;44(4):342-53. DOI: 10.1111/cdoe.12229
- Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. *Int J Paediatr Dent* 2009;19(2):73-83. DOI: 10.1111/j.1365-263X.2008.00966.x
- Elhennawy K, Manton DJ, Crombie F, Zaslansky P, Radlanski RJ, Jost-Brinkmann P-G, et al. Structural, mechanical and chemical evaluation of molar-incisor hypomineralization-affected enamel: A systematic review. *Arch Oral Biol* 2017;83:272-81. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.08.008
- Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A Tissue-Dependent Hypothesis of Dental Caries. *Caries Res* 2013;47(6):591-600. DOI: 10.1159/000351663

19. Hernandez M, Boj J, Espasa E, Planells P, Peretz B. Molar-Incisor Hypomineralization: Positive Correlation with Atopic Dermatitis and Food Allergies. *J Clin Pediatr Dent* 2018;42(5):344-8. DOI: 10.17796/1053-4625-42.5.4
20. Dzidic M, Collado MC, Abrahamsson T, Artacho A, Stensson M, Jenmalm MC, et al. Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME J* 2018;12(9):2292-306. DOI: 10.1038/s41396-018-0204-z
21. Oksanen, J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, et al. (2014) *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.2-0. Available from: <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>
22. Dray S, Dufour A-B. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J Stat Softw* 2015. DOI: 10.18637/jss.v022.i04
23. Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, et al. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol* 2015;6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00119
24. Colombo V, Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2012;83(10):1279-87. DOI: 10.1902/jop.2012.110566
25. Chan Y, Chien R. Identification and analyses of periodontal pathogens in Taiwan by microbiological tests. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1994;27(2):59-69.
26. Siqueira JF, Rôças IN. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(2):259-64. DOI: 10.1016/j.tripleo.2005.09.021
27. Li Y, He J, He Z, Zhou Y, Yuan M, Xu X, et al. Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *ISME J* 2014;8(9):1879-91. DOI: 10.1038/ismej.2014.28
28. Zhang Q, Qin XY, Jiang WP, Zheng H, Xu XL, Chen F. Comparison of Subgingival and Peri-implant Microbiome in Chronic Periodontitis. *Chin J Dent Res* 2015;18(3):155-62.
29. Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci Rep* 2017;7(1):11773. DOI: 10.1038/s41598-017-11779-9
30. Fagrell TG, Lingström P, Olsson S, Steiniger F, Norén JG. Bacterial invasion of dentinal tubules beneath apparently intact but hypomineralized enamel in molar teeth with molar incisor hypomineralization. *Int J Paediatr Dent* 2008;18(5):333-40. DOI: 10.1111/j.1365-263X.2007.00908.x

Original Article

Comparative pilot study on the qualitative differences in dental *biofilm* between teeth with molar-incisor hypomineralization and their healthy counterparts

MIGUEL HERNÁNDEZ¹, MIGUEL CARDA², ÁLEX MIRA²

¹Faculty of Dentistry. University of Barcelona. Barcelona, Spain. ²Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research (FISABIO). Valencia, Spain

ABSTRACT

Introduction: we describe for the first time the microbiota associated with molar-incisor hypomineralization (MIH).

Method: supragingival biofilm samples were taken from healthy and affected teeth of 25 children with MIH. Total DNA was extracted and the 16S rRNA gene was sequenced to describe the bacterial composition.

Results: we detected greater bacterial diversity in the MIH samples, which suggests better bacterial adhesion or a greater number of niches on these surfaces.

RESUMEN

Introducción: describimos por primera vez la microbiota asociada a la hipomineralización incisivo-molar (HIM).

Método: se tomaron muestras de biofilm supragingival de dientes sanos y afectados de 25 niños con HIM. Se extrajo el ADN total y se secuenció el gen 16S rRNA para describir la composición bacteriana.

Resultados: detectamos una mayor diversidad bacteriana en muestras de HIM, lo que sugiere una mejor adhesión bacteriana o un mayor número de nichos en esas superficies.

Conclusion: the higher protein content of the teeth affected by MIH could favor colonization by proteolytic microorganisms. Overrepresentation of bacteria associated with endodontic infections and periodontal pathologies suggests that MIH may increase the risk of other oral diseases.

KEYWORDS: Molar-incisor hypomineralization. Demineralization. Microbiology. Caries. Microbial ecology.

Conclusión: el mayor contenido de proteínas de los dientes afectados por HIM podría favorecer la colonización por microorganismos proteolíticos. La sobrerrepresentación de bacterias asociadas con infecciones endodóncicas y patologías periodontales sugiere que el HIM podría aumentar el riesgo de otras enfermedades orales.

PALABRAS CLAVE: Hipomineralización incisivo-molar. Desmineralización. Microbiología. Caries. Ecología microbiana.

INTRODUCTION

The term “molar-incisor hypomineralization” was proposed by Weerheijm (1) and accepted during the reunion of the European Academy of Pediatric Dentistry that took place in Athens in 2003 in order to define hypomineralization of a systemic origin and unknown etiology that affects one to four of the permanent first molars and is frequently associated with affected permanent incisors (2). MIH presents as asymmetrical opacities that are white, cream, yellow or brown in color in the cusp of the incisal third of the crown of the teeth affected, which vary in extension and severity (3).

The bacterial communities in the oral cavity have been studied extensively since sequencing technology has been available (4,5), and it has been ascertained that oral microbiota play an essential role in oral health (6). Currently, the commensal and pathogenic microbiota associated with various diseases including caries and periodontitis have been established (7). However, the bacterial association in some oral conditions has yet to be evaluated, and this is the case with MIH.

The disorders that arise in the secretory stage of the initial matrix during the amelogenesis process can lead to quantitative structural defects that manifest as dental hypoplasia, while those affecting the maturation or mineralization stages lead to hypomineralization or qualitative defects (8).

In general, MIH develops during the first three years of life when the mineralization process of the crowns of the permanent first molars (FPM) and permanent incisors takes place (9,10). The prevalence depends mainly on the country examined, and numbers have been reported ranging from 2.8 % to 44 % (11). In particular, the countries with lower and medium incomes and children with bad general health during the first three years of life have more probabilities of suffering MIH (12,13).

MIH can lead to serious problems such as hypersensitivity and pain, post-eruptive collapse, problems with mastication and eating, esthetic problems and treatment difficulties. In addition, poor restoration and therapeutic results make MIH a challenging condition for patients, caregivers and dentists (14).

Although it has been found that MIH is supposedly associated with prenatal exposure to possible risk factors, the most plausible explanation is that it is a multifactorial pathogenesis with a possible genetic component (15). It is believed that the origin of the problem is a disturbance in the resorption capacity of the organic matrix and the inhibition of proteolytic enzymes as a result of which proteins will be accumulated, and the space for depositing minerals will be reduced (10),

which would result in porous enamel (16). In fact, the enamel affected by MIH shows a protein content that is 3 to 21 times greater, and a hardness and elasticity that is lower than that of normal teeth (17). As a result, the structural modification of the surface of the enamel creates different niches for bacterial colonization, increasing the general risk of caries.

However, there are no studies analyzing the bacterial communities of the dental plaque on surfaces with MIH. Given previous findings on the role that oral bacteria can have in the destruction of teeth and gums depending on tissue composition (7,18), and the increase in the concentration of proteins in teeth with MIH, we raise the hypothesis that proteolytic cariogenic bacteria could significantly favor teeth affected by MIH. In order to prove this, bacterial composition and diversity of the teeth with MIH was determined by means of high throughput sequencing and compared with healthy teeth in the same patient.

MATERIAL AND METHODS

SAMPLES

The procedure for taking samples in the supragingival dental plaque of patients with MIH was approved by the Bioethics committee of the University of Barcelona (ref. IRB00003099). In this pilot study some 25 children were chosen randomly out of a group of 87 children with MIH who were aged 6 to 12 years. If we randomly came to a child with 4 permanent premolars affected, we jumped to the next child who had a healthy permanent premolar that would act as a control. All the teeth chosen with MIH had the same degree of affectation (yellow/brown opacities on the buccal aspect, no post-eruptive breakdown or atypical restorations in the rest of the teeth). None of the chosen children showed sensibility on brushing teeth with warm water that was approximately between 39 and 41 degrees centigrade.

The parents/tutors of the participants were informed of the study and they signed informed consent forms. Clinical data was taken regarding asthma, atopic dermatitis and food allergies, as recently there have been reports of a relationship between atopic dermatitis and food allergies (19) and we wanted to see if the presence of components of the allergic march were related to alterations in the oral microbiota of these patients.

Regarding preventative measures, 23 children received fluoride, once or twice a day, in toothpaste with a concen-

tration of 1450 ppm in both the consultation room and at home. Eleven children received fluoride with a concentration of 5000ppm and 22600 ppm when brushing at night and every six months respectively. Two participants did not receive any type of fluoride product because of a decision taken by their legal guardians.

The patients were asked to brush their teeth the night before, after dinner, but not in the morning in order to obtain supragingival dental plaque with 12 hour maturation that was similar among all the donors. Each sample was collected with a different sterile excavator. The teeth were not dried before taking the two samples from each patient; one sample from a MIH affected tooth and the other from the contralateral tooth (healthy control). The area sampled was similar in both the control and in the teeth affected by MIH. The material collected was placed in a microcentrifuge tube with 500 µl DNA preservation solution Isohelix (Cell Projects Ltd, Kent, United Kingdom) at room temperature until processing.

DNA EXTRACTION AND AMPLIFICATION OF THE 16S rRNA GENE

The samples were extracted using the MagNa Pure LC II DNA isolation kit (Roche®). The protocol indicated by the manufacturer was followed, but with some modifications according to Dzidic et al. (20).

The metagenomic sequencing library was prepared using the Illumina protocol in the department of sequencing of the Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of the Community of Valencia (FISABIO). The data were deposited in the SRA database (Bioproject PRJNA542627: Microbiology of molar-incisor hypomineralization lesions SRR9098974-SRR9099019).

DATA ANALYSIS

The rarefaction curves, heat maps, principal component analysis (PCoA), canonical correlation analysis (CCA) and the Wilcoxon rank sum statistical tests were performed using the Vegan (21) and ade4 (22) packages. When multiple comparisons were performed, the values of p were corrected with Bonferroni correction. The statistical tests were evaluated by comparing the MIH sample of each patient with their own healthy sample.

RESULTS AND DISCUSSION

This paper is according to our knowledge, the first study of microbial communities associated with MIH. We sequenced the 16S rRNA gene of the bacteria residing in the teeth using MiSeq Illumina in order to describe the microorganisms associated with the mineralization defects of 25 patients, and compare these with the equivalent healthy teeth in the same individuals.

Two children were excluded from the study because we were unable to obtain enough plaque material. The remaining 23 children were of a similar age, 9 ± 1.9 years and were similarly affected. Therefore, we did not consider that these two factors would lead to a significantly variation in the results obtained.

According to their medical records, 10 children (7 girls and 3 boys) had atopic dermatitis, 3 children (2 boys and a girl) had food allergies, 3 boys had asthma and two girls had celiac disease.

MICROBIAL DIVERSITY IN HYPOMINERALIZED AREAS

Curiously when all the samples from each category were grouped together in (healthy or hypomineralized teeth), and on analyzing the bacterial richness and diversity of the associated microbiota, the rarefaction curves (that related the sequencing effort with the estimated number of species) obtained for each corresponding group of MIH samples showed greater microbial diversity than that of the non-affected or control teeth (Fig. 1).

In addition, the rates of diversity and richness on using Shannon, Chao1 and ACE support this study (Table I). Generally, when microbiotas are compared in a healthy state and in a dysbiotic state, greater diversity is found in healthy teeth, as occurs when the surfaces of healthy teeth are compared with carious lesions of the enamel or dentine (18).

On some occasions the opposite has been observed, such as in periodontal pockets vs. healthy gingival sulci (23). This has been associated with a greater availability of nutrients or an impaired immune system in the areas affected, which would facilitate microbial colonization (7). In the case reported in this paper, we raise the hypothesis that enamel breakdown affects porosity and that therefore the adherable surface of a tooth increases. As a result, the number of bacteria attached increases and therefore diversity.

In addition, the greater protein content of MIH lesions could also favor a larger or more diverse microbial community, particularly of proteolytic organisms. The possibility should also be considered that the hypersensitivity of MIH

**TABLE I.
COMPARISON OF THE BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH HEALTHY AND MIH TEETH. DIVERSITY AND RICHNESS INDICES OF SPECIES IS BOTH GROUPS CALCULATED FOR 20,000 READS FOR EACH SAMPLE**

<i>Index</i>	<i>Hipo</i>	<i>Control</i>
n	204.17	180.83
Shannon	4.36	4.11
Chao1 ± SE	208.14 ± 4	184.08 ± 3
ACE ± SE	207.02 ± 5	183.08 ± 5

n: number of species (OTUs); SE: standard error.

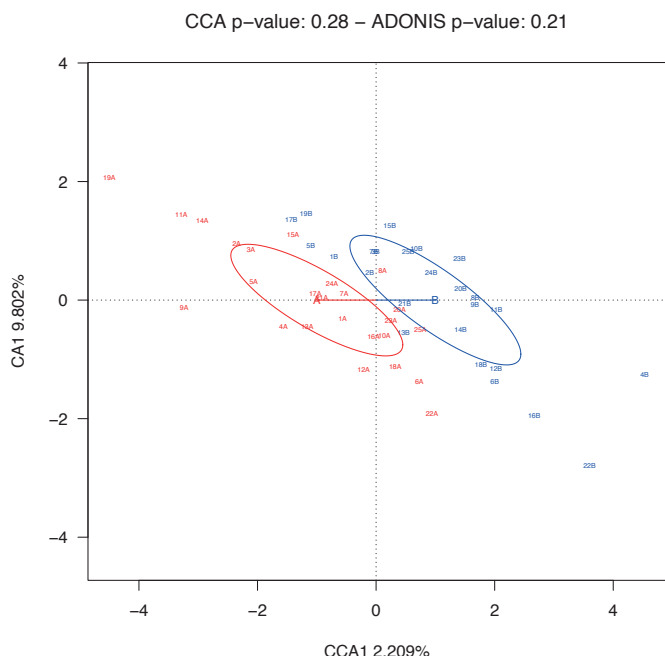


Fig. 1. Comparison of bacterial communities associated with healthy and MIH affected teeth. Analysis of the bacterial diversity of the microbiota associated with healthy teeth (blue) versus hypomineralized teeth (brown). Canonical correspondence analysis (CCA) showing how the samples from healthy and hypomineralized teeth group together according to the principal component analysis performed in all the samples and based on the relative abundance of each bacterial genus.

teeth causes patients to brush teeth affected by MIH more gently or less frequently than unaffected teeth, and this could lead to an uneven accumulation of plaque.

MICROBIAL COMPOSITION IN HYPOMINERALIZED AREAS

The analysis of microbial composition regarding gender reflected minor differences between the regions with hypomineralization and control areas (Fig. 2). In both cases, we found very diverse microbiota in which *Streptococcus* (12 %) and *Leptotrichia* (10 %) were the most abundant type while *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Porphyromonas* and *Saccharimonadaceae* obtained similar percentages (2-5 %), affecting 70 % of the population in both scenarios.

In order to understand the origin of these differences, we grouped the MIH samples according to various patient characteristics: atopic dermatitis, food allergies or asthma (19), if treated with fluoride or the quantity of teeth affected. Only when the samples had been classified into two groups according to the number of hypomineralized teeth (≤ 3 [low] or ≥ 4 [high]), did the groups become significant ($p = 0.04$). This suggested that the degree of involvement influenced microbial composition, but there was no correlation between bacterial composition and the other characteristics studied in the medical history of the patients.

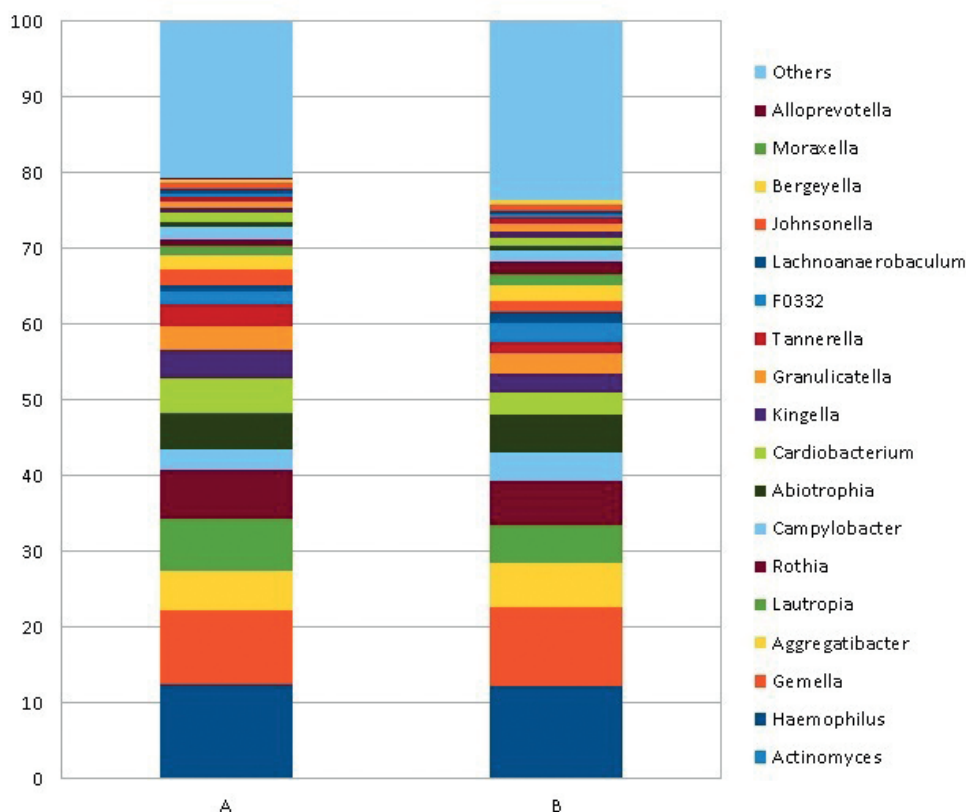


Fig. 2. Comparison of bacterial communities associated with healthy teeth (A) and hypomineralized teeth (B). Median of most abundant bacterial genera determined by Illumina sequencing of the 16S rRNA gene.

Colombo et al. (24) detected a significant prevalence of *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Lautropia*, *Veillonella* and *Rothia* in patients with successful periodontal treatment, that were all more abundant in our control samples. In addition, we found other examples of studies that associated periodontitis with species related with hypomineralization. For example *Centipeda periodontii* has been associated with periodontitis in Taiwanese patients (25). Siqueira and Roças (26) found *Catonella morbi* in 33 % of the root canals in chronic apical periodontitis and in 26 % of the primary endodontic infections on amplifying the 16S rRNA gene. Finally, in the two studies that used next generation sequencing technology and in which microbiota were compared of healthy patients with that of patients with periodontitis, a significant abundance of *Catonella* was detected in those affected (27,28).

Moreover, *Campylobacter*, *Centipeda*, *Alloprevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* and *Catonella* formed part of the 17 taxons (taxons are a group of related organisms that in a given classification have been grouped together and given a Latin name, a description if a species and a type) that were significantly enriched in the oral samples of patients with oral cancer (29). In this same study Zhao et al. (29) found *Lautropia*, *Veillonella*, *Rothia* and *Actinomyces* associated with the controls. It should be kept in mind that most of the bacterial species associated with hypomineralized lesions are highly proteolytic, which suggests that the greater protein content in these areas may favor the growth of bacteria that are associated with various oral and systemic diseases.

In conclusion, although the differences between healthy and hypomineralized teeth are small, there are some taxons that appear to be significantly associated with each situation.

Although we do not have samples of healthy individuals in our study, the differences detected according to the severity of the disease suggest that MIH can select bacteria associated with the disease and that contrary to our expectations these are not saccharolytic and they were related with caries risk. In addition, most of the taxons found to be associated with hypomineralized teeth in the present study had previously been associated with other oral diseases.

This suggests that MIH could be related not only with the progression of caries due to reduced mineral content but also to a greater risk of periodontal disease due to higher levels of bacteria associated with this condition. Therefore, we suggest that future studies, especially longitudinal studies, investigate if the pathogenic communities associated with MIH can increase the risk of other oral and systemic diseases that are influenced by proteolytic microorganisms. Moreover, these studies should clarify if the pathogen community associated with MIH teeth is only a consequence of the disease or if it can contribute to its progression. For example, the proteolytic bacteria detected in the current paper could degrade the high protein content of teeth affected by MIH, encouraging microbial invasion of dentinal tubules, which has been demonstrated by means of electron microscopy (30), and contribute to cavities and hypersensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We were able to carry out this research thanks to financial support from the Research Grant awarded by the Spanish Society of Pediatric Dentistry.