

Caracterización de la microbiota salival en estudiantes de la facultad de odontología Udelar consumidores de yerba mate

Autor

Dra. Bárbara Sofía García Fontana

Tutoras

PhD. María Lucía Spangenberg Torre

PhD. Tamara Fernández Calero

Maestría en Ciencias Odontológicas opción Biología Oral.

Facultad de Odontología, Universidad de la República.

Montevideo - Uruguay

Octubre 2024

***Tesis presentada en la Maestría en Ciencias
Odontológicas Opción Biología Oral, Facultad de Odontología,
Universidad de la República, como parte de los requisitos
necesarios para la obtención del título de Magíster en Ciencias
Odontológicas***

Dedicatoria

*A mi abuela Aída, siempre en mi corazón. A mis padres y hermano, por su apoyo constante.
Y a mis sobrinas, con todo mi cariño.*

Agradecimientos

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a mis tutoras, Lucía y Tamara, por su guía y apoyo durante todo el proceso de esta tesis.

Equipo de Investigación

Dra. Bárbara García. Alumna de maestría. Asistente, Grado 2 efectivo. Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Odontología. Udelar.

Prof. PhD. Tamara Fernández Calero. Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

Prof. PhD. María Lucía Spangenberg Torre. Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay

Análisis estadístico:

PhD Hugo Naya. Institut Pasteur de Montevideo / Uruguay. Unidad de bioinformática

García, Bárbara

Caracterización de la microbiota salival en estudiantes de la Facultad de Odontología Udelar consumidores de yerba mate / Bárbara García. -

Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Odontología, 2024

Tutores:

PhD. Tamara Fernández Calero

PhD. María Lucía Spangenberg Torre

**Tesis de Maestría - Universidad de la República, Ciencias Odontológicas
opción Biología Oral, 2024**

Referencias bibliográficas, p. (58) - (65).

1. 1ra Yerba Mate, 2. 2da Microbiota oral, 3. 3ra Salud oral, 4. 4ta Saliva.

**I. Fernández Calero, Tamara; Spangenberg Torre, María Lucía. II. Institut
Pasteur de Montevideo / Uruguay. III. Profesoras, PhD.**

CONTEXTO DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

El presente estudio se realizó en la Facultad de Odontología, perteneciente a la Universidad de la República, Montevideo-Uruguay durante los años 2023 y 2024. La parte experimental tuvo lugar en la Facultad de Odontología UdelaR, a estudiantes de la institución, mientras que el procesamiento y análisis de las muestras del proyecto se llevó a cabo en conjunto con el Institut Pasteur de Montevideo.

SUMARIO

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	14
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
6. METODOLOGÍA	18
6.2. Diseño del estudio y muestra	19
6.3. Sujetos de estudio	19
6.4. Criterios de inclusión	20
6.5. Criterios de exclusión	20
6.6. Variables	20
6.7. Toma de la muestra	21
6.8. Extracción de ADN y preparación de bibliotecas de secuenciación.	22
6.9. Control de calidad y sesgos	23
6.10. Análisis de los datos	23
7. RESULTADOS	24
7.1. Muestreo	24
7.2. Extracción de ADN y secuenciación del gen 16S	32
7.3. Análisis de las comunidades microbianas en la saliva de consumidores y no consumidores de yerba mate	35
8. DISCUSIÓN	54
9. CONSIDERACIONES FINALES	56
10. REFERENCIAS	57
11. ANEXOS	64
11.1. Consentimiento informado	64
11.2. Cuestionario para el participante	66
11.3. Aval del Instituto de Bioinformática	68
11.4. Aprobación del comité de bioética.	69
11.5. Diagrama del protocolo del Kit de extracción de ADN:	70
11.6. Reads resultate por muestra	71
11.7. Script en DADA2 para detección de ASVs	73
11.8. Clasificación taxonómica de las bacterias presentes en la saliva de consumidores y no consumidores de yerba mate.	74
11.9. Pruebas de normalidad.	75
11.10. Pruebas de homogeneidad.	76

1. RESUMEN

Marco teórico: En el área de la salud oral y el estudio de las enfermedades bucales la microbiota representa un papel crucial. El desarrollo de los agentes que perturban el equilibrio de los componentes que conforman la microbiota oral, generan diferentes patologías a nivel bucal, como por ejemplo la periodontitis, caries dental, incluso inciden en el desarrollo del cáncer bucal y gastrointestinal. No obstante aún queda mucho por investigar sobre la relación exacta entre el microbioma oral y la progresión de estas malignidades. **Justificación:** El consumo de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) se encuentra culturalmente extendido en la población uruguaya. Es por esto que resulta de gran importancia asociar su consumo a posibles diferencias en la diversidad bacteriana. Estos hallazgos podrían sumar evidencia científica de las posibles recomendaciones a la población del consumo de esta bebida. **Objetivo:** El objetivo de este estudio es establecer las diferencias en la microbiota salival de estudiantes consumidores (siendo estos bebedores de la bebida en más de 1 L diario) y no consumidores de yerba mate en una muestra salival tomada en la Facultad de Odontología de la Universidad de la República (UdelaR), Uruguay, durante el año 2023-2024. **Métodos:** Las muestras de saliva se obtuvieron de 104 estudiantes de Facultad de Odontología UdelaR, de las cuales 53 fueron seleccionadas para el análisis mediante secuenciación del gen 16S rRNA (Illumina), enfocándose en la identificación y comparación de taxones microbianos. Se consideraron variables demográficas como la edad, sexo y ascendencia étnica y dietéticas como el consumo de yerba mate, tipo de yerba, consumo de agua, té verde, café, té negro y probióticos. **Resultados:** De las 104 muestras, solo 53 fueron secuenciadas, para 25 consumidores y 28 no consumidores. Los resultados mostraron que los consumidores de yerba mate tienen una mayor riqueza de especies, como lo refleja el índice de Chao1 y el número promedio de variantes de secuencias amplicónicas (ASV), siendo 495 ± 140 para consumidores frente a 418 ± 71 para no consumidores ($p = 0.029$). Aunque no se observaron diferencias significativas en la diversidad según el índice de Shannon, los géneros más abundantes en ambos grupos fueron *Streptococcus* y *Prevotella*, con una mayor presencia de *Prevotella* en consumidores de yerba mate. Estos hallazgos sugieren que el consumo de esta bebida podría estar asociado a una comunidad microbiana más diversa y resiliente. **Consideraciones finales:** Aunque este estudio reveló una

mayor diversidad microbiana en los consumidores de yerba mate, los resultados no fueron concluyentes para establecer un efecto directo de esta bebida en la microbiota salival. Se requieren más investigaciones para comprender mejor la naturaleza de esta asociación y sus implicaciones para la salud bucal y general.

PALABRAS CLAVE: yerba mate, microbiota oral, salud oral, saliva.

2. INTRODUCCIÓN

El conjunto de microorganismos que habitan dentro de los diferentes órganos y sistemas del cuerpo humano, están conformados por 10 a 100 billones de células microbianas simbióticas, las cuales están principalmente representadas por bacterias del intestino (Guarner, 2007). Después del intestino, la cavidad oral tiene la segunda microbiota más grande y diversa (Deo y Deshmukh, 2019a). Es por esto, que la cavidad oral, con sus diferentes nichos, es un hábitat extraordinariamente complejo donde los microorganismos colonizan las superficies duras de los dientes y los tejidos blandos de la mucosa oral (Deo y Deshmukh, 2019a; Paster et al., 2006).

La microbiota oral se compone principalmente por bacterias Gram Positivas como los géneros *Abiotrophia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Stomatococcus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, destacando *Streptococcus* con más de 43 especies. Por su parte, entre las bacterias Gram Negativas se encuentran los géneros *Moraxella*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Hemophilus*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Seimonas*, *Simonsiella*, *Treponema*, *Wolinella* (Deo y Deshmukh, 2019a).

Asimismo, en el área de la salud bucal y el estudio de las enfermedades bucales la microbiota representa un papel crucial afectando condiciones que van desde la caries hasta el cáncer oral. Aunque esta asociación no implica una causalidad directa. El desarrollo de agentes que perturban su equilibrio generan diferentes patologías a nivel bucal como la caries, la periodontitis e incluso cáncer bucal y del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, tres microorganismos que se han descrito por estar relacionados en el inicio y desarrollo de la caries dental son: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. y *Actinomyces viscosus*, siendo el *S. mutans* el que presenta el mayor potencial cariogénico. Aunque, para que la lesión cariosa ocurra, es necesario a su vez la conjunción de diversos factores (Liébana Ureña, 2002).

Fusobacterium nucleatum, especie encontrada en la cavidad oral, se considera un factor promotor fundamental del cáncer colorrectal (CCR). También, se ha

confirmado que el estado de salud periodontal está asociado con el cáncer de esófago y el cáncer de páncreas (Badanian et al., 2019). Índices desarrollados para la detección del desequilibrio en salud bucal podrían usarse para predecir múltiples problemas de salud general, ya que la cavidad bucal podría actuar como una ventana hacia áreas más profundas del cuerpo humano (Huartamendia et al., 2012).

Todas estas bacterias habitan en diferentes nichos orales, incluida la saliva, la placa supra y subgingival, y la mucosa (Paster et al., 2006). De estos nichos, la saliva es considerada un sistema multifactorial en la cavidad oral, sirve como un medio de detección no invasivo para monitorear cambios en la microbiota que pueden reflejar la salud bucal y general del individuo. Se segregan entre 700 a 800 mL de saliva diarios, que emergen asépticos a la cavidad bucal (Negroni, 2009). La saliva constituye un reservorio de microorganismos derivados regularmente de las biopelículas de la placa dental que se adhieren a las grietas gingivales, las bolsas periodontales, el dorso de la lengua y otras superficies mucosas orales, esta puede albergar hasta 10^8 bacterias/mL (Velden et al., 1986). A partir de diferentes estudios, se ha identificado que la microbiota salival está conformada por unas 700 especies bacterianas, que se encuentran comúnmente en la cavidad oral humana, de las cuales el 54% tienen nombre oficial asignado, 14% no tienen nombre (pero se cultivan) y 32% se conocen sólo como filotipos no cultivados (Deo y Deshmukh, 2019b).

Debido a la velocidad de deglución, la microbiota no puede mantener estable sus niveles poblacionales en la saliva, por este motivo se considera que la saliva no cuenta con una microbiota propia residente (Marsh et al., 2016). Sin embargo, la presencia de ciertos organismos en la saliva se han empleado como marcadores que permiten la diagnosis de varias enfermedades y la misma puede proporcionar una “ventana” a la salud de un individuo. Es por esto que la microbiota salival puede proporcionar una mayor comprensión de la estructura integral de la microbiota dentro de la cavidad bucal humana, e incluso del estado de salud bucal y general de las personas (Cruz Quintana et al., 2017).

Aunque existen diferencias en la diversidad bacteriana de la microbiota oral entre personas sanas, la diversidad bacteriana de la microbiota salival permanece relativamente constante para cualquier persona a lo largo del tiempo, cuando esa

persona se encuentra en buenas condiciones de salud (Goodson et al., 2017). El nivel de cada componente salival varía considerablemente según el estado de salud del individuo y la presencia de microorganismos patógenos y comensales (Cruz Quintana et al., 2017).

Así es posible establecer que la saliva juega un papel importante en la salud bucodental, por ejemplo una reducción en el flujo de saliva aumenta el riesgo de caries dental (Marsh et al., 2016). La saliva favorece la relación beneficiosa natural entre la microbiota y el huésped, esto implica mantener un pH favorable para el crecimiento bacteriano, la eliminación de sustratos exógenos y el suministro continuo de nutrientes para la microbiota beneficiosa que reside en cavidad oral (Marsh et al., 2016). Los episodios repetidos de pH bajo en la biopelícula causan un cambio en el equilibrio de la microbiota al impulsar la selección de bacterias potencialmente cariogénicas a expensas de las especies beneficiosas (Bradshaw y Marsh, 1998). Recientes modelos computacionales han demostrado la importancia de que la saliva amortigüe y evite que el pH de la placa caiga por debajo de los valores críticos para mantener una microbiota favorable (Head et al., 2014).

Metagenómica 16S: Este estudio utiliza la técnica de metagenómica 16S para identificar y caracterizar las comunidades microbianas presentes en la saliva, una técnica poderosa y ampliamente utilizada en la investigación de ecosistemas microbianos complejos como la cavidad oral.

La metagenómica 16S permite el análisis del ADN total extraído directamente de las muestras, comparándolo con bases de datos para identificar diferentes especies bacterianas. En lugar de cultivar cada microorganismo de manera individual, este enfoque ofrece una visión integral de las bacterias presentes. El ARN ribosomal 16S es una región altamente conservada del ADN bacteriano que actúa como un marcador molecular para identificar especies. Este gen contiene regiones variables (V1-V9) que permiten distinguir entre especies cercanamente relacionadas, mientras que sus regiones conservadas facilitan el diseño de primers universales para la amplificación. La técnica consiste en amplificar una o más de estas regiones variables (por ejemplo, V3-V4) a partir del ADN extraído, seguido de una secuenciación con plataformas de última generación (NGS) como Illumina, una de las más utilizadas a nivel mundial.

Análisis de datos: Una vez secuenciado el gen 16S, las lecturas obtenidas se comparan con bases de datos taxonómicas para identificar las bacterias presentes en la muestra. Esta técnica permite caracterizar la composición bacteriana de manera precisa, cuantificar la abundancia relativa de las diferentes especies y estudiar la diversidad microbiana (Serrano-Coll et al., 2015)

En este tipo de estudios de metagenómica 16S, se utiliza muchas veces un enfoque de identificación de ASV (Amplicon Sequence Variants), que corresponde a secuencias exactas creadas por el secuenciador, en contraposición con los ASVs (Operational Taxonomic Unit) que requieren un post-procesamiento basado en similitud (generalmente de un 97%) de los datos de secuenciación (agrupación de varias secuencias similares para definir un OTU). Los ASVs permiten una resolución más alta al identificar cada secuencia única de amplicón a nivel de una sola mutación.(Valenzuela-González et al., 2015)

La composición del microbioma oral no sólo está influenciada por la edad e ingesta de medicamentos, sino también por variables adicionales, incluyendo la genética del hospedero, el sexo, el nivel socioeconómico, la etnia y la geografía, las cuales pueden reflejar variaciones en la dieta, y la convivencia de cada individuo (Topcuoglu y Kulekci, 2015). En nuestro estudio se consideraron factores como la edad, el sexo, la etnia y ciertos hábitos dietéticos.

Por ejemplo, estudios comparativos entre poblaciones europeas, africanas, asiáticas y norteamericanas mostraron una variación microbiana entre poblaciones, así como un microbioma oral conservado en grupos étnicos específicos con diferencias interindividuales (Gupta et al., 2017). En daneses el microbioma salival contiene poblaciones estables a largo plazo y se observan géneros como *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp., *Rothia* spp. y *Neisseria* spp., así como las especies periodontopatógenas *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* y *Parvimonas micra*. De manera contrastante, en una población española, el microbioma salival reporta la presencia de los géneros *Prevotella* spp. y *Veillonella* spp. (Gómez-García et al., 2022). Mientras que, en una población japonesa, se pueden observar cambios inter e intra individuales, donde se ha observado que los phyla Actinobacterias, Bacteroidetes, Spirochaetes, Firmicutes, Proteobacterias, SR1 y *Synergistes* varían significativamente a nivel interindividual, pero estos taxones se mantienen estables

a nivel interindividual, con excepción de SR1 y *Synergistes* spp (Gómez-García et al., 2022). Lo anterior muestra que el microbioma oral es significativamente distante entre individuos, incluso entre una misma población, lo que podría apoyar la propuesta del uso del microbioma oral como huella digital (Ikeda et al., 2019)

No se puede ignorar el impacto de los factores nutricionales en la conformación del ecosistema microbiano oral. Los residuos de alimentos en la boca se pueden utilizar como sustratos para las bacterias orales. Además, algunos componentes de los alimentos tienen un efecto selectivo sobre el crecimiento microbiano, ya sea estimulando o suprimiendo algunas bacterias específicas (Chinsembu, 2016; Musarra-Pizzo et al., 2019).

Entre los alimentos que han demostrado poseer efectos en la supresión de ciertas bacterias se encuentran bebidas como el té (Bansal et al., 2013), que ha mostrado la inhibición en la producción de ácidos en las especies del género *Streptococcus*, causante de la caries dental (Ooshima, 2005). Es por esto que infusiones como la yerba mate, proveniente de la planta del *Ilex paraguariensis* pueden también presentar este potencial. La yerba mate es una infusión de color verde, muy popular y comunmente consumida en los países de America Latina (sur de Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay), ganando rápida penetración en los mercados mundiales, incluido Estados Unidos (Heck y De Mejia, 2007). Entre la población uruguaya, esta bebida representa un ícono local y de acuerdo a los últimos datos disponibles del Ministerio de Salud Pública de Uruguay en 2006 un 85,2% de la población consume mate (Ríos Duarte, 2019). Por otro lado, la composición de la yerba mate se ha caracterizado parcialmente, esta incluye una variedad de polifenoles, xantinas, saponinas y minerales que pueden ser responsables de la actividad farmacológica (Bracesco et al., 2011; Heck y De Mejia, 2007).

Infusiones como el té negro, té verde y la yerba mate han demostrado poseer propiedades quimiopreventivas del cáncer (Chen et al., 2009; Heck y De Mejia, 2007; Wang et al., 2006). Estos beneficios se atribuyen en gran medida a la presencia de compuestos polifenólicos, como el galato de epigallocatequina, el compuesto activo más abundante en el té verde, que ha mostrado bloquear la progresión del cáncer (Liu et al., 2015). Por otro lado, estudios han sugerido que las hojas de la yerba mate contiene una mezcla compleja de polifenoles, xantinas y

saponinas, que se han asociado con propiedades antioxidantes, antiobesidad, diuréticas, quimiopreventivas, antidiabéticas, antifúngicas, entre otras (Andersen y Fogh, 2001; Pagliosa et al., 2010). Estudios previos han demostrado que las bebidas ricas en polifenoles, como el té verde, pueden suprimir ciertas bacterias patógenas, al tiempo que promueven un microbioma más equilibrado. De manera similar, se ha sugerido que los compuestos presentes en la yerba mate, incluyendo polifenoles, xantinas y saponinas, podrían ejercer efectos beneficiosos sobre la microbiota. Entre los beneficios asociados al consumo de yerba mate se destacan su efecto antioxidante, propiedades antiinflamatorias y la capacidad de estimular el sistema nervioso central. Además, experimentos realizados en modelos animales han encontrado que la administración del extracto de yerba mate promueve el incremento de colonias de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* sp. y *Prevotella* sp. en la microbiota intestinal. Estos efectos sugieren que los compuestos bioactivos de la yerba mate podrían modular positivamente la composición microbiana en distintos sistemas del cuerpo, contribuyendo a la salud general del consumidor (Santos et al., 2023). A pesar de esto, se debe tener en cuenta que un consumo excesivo de yerba mate, especialmente a una temperatura elevada, puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer, lo que sin embargo, no ha sido probado de manera unívoca (Lutomski et al., 2020).

Como la población de diferentes países de Latinoamérica tiene la costumbre de consumir la yerba mate con frecuencia, resulta conveniente evaluar el papel del mate caliente en el aumento del riesgo de cáncer de esófago, laringe y cavidad oral (Loria et al., 2009), debido a la temperatura con la que se prepara la bebida, que podría actuar dañando la mucosa o acelerando reacciones metabólicas, incluidas aquellas con sustancias cancerígenas en el tabaco y el alcohol (Bayo Calero, 2017). Por otro lado, la evaluación del efecto de la yerba mate sobre la microbiota salival, permite establecer los posibles riesgos o beneficios asociados en su consumo.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Adami et al. (2018) estudiaron el consumo del extracto de té verde, demostrando la capacidad de prevenir cáncer oral e inhibir la progresión del cáncer en modelos de roedores. De esta forma los autores caracterizan el efecto del té verde sobre la microbiota asociado al epitelio oral humano. Demostrando que el consumo de té puede ocasionar cambios constantes en las bacterias orales, lo que puede afectar la carcinogénesis, pero argumentan que los efectos del té verde en la expresión del mRNA epitelial oral en humanos varían entre individuos. Tanto el té verde como la yerba mate poseen estrecha vinculación, ya que ambos poseen propiedades antioxidantes que reducen el estrés oxidativo y contienen minerales y vitaminas. La yerba mate tiene más antioxidantes que el té verde y su alto contenido de polifenoles mejora las defensas naturales del organismo, por su parte el té verde contiene epigallocatequina galato, que puede ayudar a combatir enfermedades inflamatorias. La mezcla de ambos elementos retrasa el envejecimiento celular y tiene efecto diurético, además preserva el corazón ya que contiene bioflavonoides que regulan el colesterol y reducen el riesgo de enfermedades cardíacas y contribuye a la salud bucal puesto que posee flúor.

Balappanavar (2020), en una revisión sobre el té y la salud bucal, encuentra que esta bebida tiene efectos sobre los microorganismos orales, propiedades anticariogénicas, reducción de la gingivitis y periodontitis. El té verde ha demostrado tener efectos bactericidas sobre las especies *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella*. Se ha observado que la inflamación gingival disminuye y tiene una marcada reducción en el tamaño de la bolsa periodontal en pacientes bebedores de té verde (Balappanavar, 2020).

Por otro lado, estudios en ratones expuestos al humo de cigarrillo y tratados con yerba mate, determinaron que esta infusión puede reducir la inflamación pulmonar producto del tabaquismo (Lanzetti et al., 2008) indican que la acción antiinflamatoria de la infusión puede estar relacionada con la disminución de la expresión de citoquinas inflamatorias, el flujo de entrada celular y la actividad metabólica celular. Estos mecanismos pueden promover la supervivencia celular debido a su prevención, intercepción y protección reparadora contra el peroxinitrito que provocan el daño del ADN y la muerte celular.

García Padilla (2015) se centró en el efecto antibacteriano del té verde como colutorio, concluyendo que esta infusión puede reducir significativamente la formación de placa bacteriana y la cantidad de bacterias en la saliva. Esto se debe a los flavonoides presentes en el té verde, que tienen propiedades antimicrobianas. Funosa *et al.* (2005) estudiaron el impacto del té verde en la periodontitis y concluyeron que, cuando se combina con terapia periodontal mecánica, el té verde puede ayudar a revertir las condiciones clínicas de la enfermedad. Aunque no se observaron diferencias significativas en la microbiota entre los grupos tratados con té verde y los de control, se sugirió que el té verde puede ser una opción complementaria en el tratamiento periodontal.

Diferentes estudios han determinado los efectos benéficos en humanos de infusiones cotidianas como el té, la manzanilla y la yerba mate. Por esta razón, el estudio de Larrucea *et al.* (Larrucea *et al.*, 2013) selecciona aquellas infusiones de uso habitual con el fin de caracterizar sus efectos inmediatos sobre las propiedades de la saliva. Con 37 sujetos sanos, entre 18-23 años, de bajo riesgo cariogénico se obtuvieron 3 muestras de saliva no estimulada. Se determinó que el efecto de algunas infusiones es positivo sobre las propiedades salivales, destacando la Infusión de manzanilla, y la yerba mate las cuales aumentan significativamente el flujo y la capacidad buffer salival, lo cual sugiere un efecto benéfico en la prevención de caries.

En el caso de la yerba mate, Filip *et al.* (2007) sugieren que los extractos de la planta podrían ser útiles en la prevención de patologías orales ya que posee antioxidantes naturales que pueden tener una potencial acción quimioprotectora en los tejidos orales debido a su acción de promover un aumento de la actividad de la peroxidasa secretada. Por otro lado, se ha observado una menor puntuación en la intensidad de dolor después de cirugías del tercer molar en sujetos que bebían mate con regularidad (Bortoluzzi *et al.*, 2011).

La infusión de yerba mate ha sido empleada experimentalmente para simplificar la técnica de preparación de láminas de citología para evaluar la frecuencia de micronúcleos (FMic) de las células epiteliales bucales (Bortoluzzi *et al.*, 2011). En esta investigación se encontró que la infusión no indujo un aumento de FMic en las células bucales exfoliadas de sujetos sanos, demostrando ser fiable, sin pérdidas en

comparación con la técnica convencional y con la ventaja de eliminar sustancias tóxicas, convirtiéndola en una técnica sencilla y práctica para la investigación odontológica.

Es importante destacar que no se conocen estudios previos del efecto del consumo de yerba mate sobre la microbiota salival en Uruguay.

4. JUSTIFICACIÓN

Los hábitos y costumbres de los individuos en su vida cotidiana influyen en su salud, generando situaciones que pueden ser beneficiosas o perjudiciales. Se ha confirmado que beber yerba mate aporta una serie de efectos positivos, incluyendo efectos protectores sobre las células del hígado, estimulación del sistema nervioso central, propiedades antiinflamatorias y beneficios para el sistema cardiovascular. Esto se recomienda como una sugerencia basada en la bibliografía actual.

En el campo de la odontología, es esencial estudiar los factores que afectan el equilibrio de la microbiota oral, dado que su desregulación puede contribuir al desarrollo de diversas patologías orales y sistémicas. A diferencia de estudios anteriores que han explorado la influencia de otras bebidas en la microbiota oral, este es uno de los primeros que se centra en la yerba mate, proporcionando una visión novedosa sobre los posibles beneficios o riesgos asociados con su consumo. Las técnicas avanzadas de secuenciación masiva, como el metabarcoding 16S, han revolucionado esta área de investigación, permitiendo la identificación y cuantificación de especies cultivables y no cultivables al analizar el gen ribosomal 16S de microorganismos presentes en las muestras (Paster et al., 2006).

Caracterizar la composición de microorganismos de la saliva de los consumidores y no consumidores de yerba mate puede contribuir a sumar evidencia científica sobre los posibles efectos de esta bebida en la salud. Se trata de una investigación pionera, sin antecedentes en el país ni en la región, que también supone una valiosa colaboración interdisciplinar entre la odontología y la bioinformática

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar la microbiota salival de estudiantes consumidores y no consumidores de yerba mate de la Facultad de Odontología - UdelaR

5.2. Objetivos específicos

- 1) Analizar los hábitos de consumo de alimentos, bebidas y de higiene bucal de la población en estudio.
- 2) Caracterizar la microbiota salival por medio de técnicas de secuenciación del gen 16S en estudiantes consumidores y no consumidores de yerba mate.
- 3) Comparar posibles diferencias de la microbiota salival en estudiantes consumidores y no consumidores de yerba mate.
- 4) Evaluar si las diferencias observadas en la composición de la microbiota salival están significativamente asociadas al consumo de yerba mate.

6. METODOLOGÍA

6.1. Consideraciones éticas

Se realizó una invitación pública a estudiantes de la Facultad de Odontología - UdelaR para participar en el estudio, asegurando que la participación fuera completamente voluntaria. Se tomaron todas las medidas necesarias para garantizar que los estudiantes no se sintieran obligados o presionados a participar, promoviendo una participación libre de cualquier tipo de coacción. La invitación fue abierta y no estuvo condicionada por la relación de los estudiantes con los cursos de las carreras impartidas en la Facultad, lo que permitió una selección equitativa y

transparente de los participantes. No se ofreció ningún tipo de retribución económica por la participación.

A cada estudiante se le proporcionó un documento de consentimiento informado y un cuestionario (Anexo 11.1 y 11.2), en el que se explicaba en detalle el alcance, los objetivos y los procedimientos del estudio, así como los derechos de los participantes. Los participantes fueron informados de que los resultados agregados podrían ser publicados en revistas científicas, asegurando que no se incluirían datos que permitieran identificar a los individuos, protegiendo así su privacidad y confidencialidad.

Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología - UdelaR, mediante resolución N°1 del 19 de julio del 2023 (Exp. 091900-000014-22) (Anexo 11.4).

6.2. Diseño del estudio y muestra

El estudio adoptó un diseño observacional transversal y analítico, comparando dos grupos: un grupo control compuesto por sujetos no consumidores de yerba mate y un grupo de interés formado por consumidores de yerba mate. Se evaluó la microbiota salival de ambos grupos mediante secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA, utilizando técnicas de secuenciación masiva. Para establecer los hábitos de consumo y registrar datos clínicos relevantes, se solicitó a los participantes que completaran un cuestionario escrito (Anexo 11.2). A partir de la información obtenida en el cuestionario y de una inspección visual de la cavidad oral, se determinó si los voluntarios cumplían con los criterios de inclusión para el estudio. Los criterios de elegibilidad utilizados fueron ser estudiante de la Facultad de Odontología de UdelaR, sin patología sistémicas, que dieran su consentimiento y no presenten a la inspección visual patología bucal visible.

6.3. Sujetos de estudio

Los sujetos del estudio estuvieron conformados por 104 estudiantes de la Facultad de Odontología UdelaR, de los cuales 50 eran consumidores de yerba mate (1L o más), 8 consumidores moderados (cerca de medio litro) y otros 54 no

consumidores. Este número de sujetos fue consultado con un estadístico encargado

de la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo (Anexo 11.3). La elección de este número fue establecido por razones de disponibilidad de fondos, factibilidad y suficiencia del mínimo admisible para proporcionar el análisis de los datos.

6.4. Criterios de inclusión

- Estudiantes de la Facultad de Odontología UdelaR.
- Personas mayores de 18 años que no reporten ninguna patología sistémica o condición médica preexistente que pueda influir en la composición de la microbiota oral, según el cuestionario inicial.
- Participantes que hayan otorgado su consentimiento informado por escrito, indicando su disposición para colaborar en la investigación.
- Ausencia de signos de patología bucal evidente tras inspección visual. Esto fué verificado tras inspección visual por un profesional para asegurar que no hubiera lesiones visibles que puedan alterar los resultados.

6.5. Criterios de exclusión

- Participantes con enfermedades sistémicas diagnosticadas, mujeres embarazadas o en estado de puerperio.
- Personas bajo tratamiento con medicamentos que puedan alterar la composición de la microbiota oral, incluyendo antibióticos, antifúngicos, antihistamínicos, antidepresivos, antihipertensivos, corticoides inhalados y antirretrovirales, o aquellos que hayan consumido antibióticos o colutorios en los 15 días previos a la recolección de la muestra.
- Participantes que consuman al menos medio litro de mate diario (para el caso de los consumidores).

6.6. Variables

Se evaluaron diferentes variables. Por un lado, la variable dependiente para las determinaciones de abundancias relativas corresponde a la composición de la microbiota oral. Por otro lado, las variables independientes para las determinaciones de abundancias relativas incluyen (entre otras) el consumo de yerba mate.

Para todos los análisis:

Grupo control: Participantes no consumidores de yerba mate. (NCYM)

Grupo de interés: Participantes consumidores de yerba mate, con un consumo regular de medio litro o más al día.

6.7. Toma de la muestra

Previo a la recolección de la muestra, se proporcionó a cada participante una explicación detallada sobre el estudio de manera oral. En esa instancia, se les brindó información acerca de los procedimientos del estudio, se presentó el consentimiento informado para su firma y se explicó el cuestionario a completar (Anexo 11.1). El cuestionario (Anexo 11.2) recopiló datos demográficos como sexo, edad, peso y estatura, además de información sobre los hábitos de consumo de yerba mate y hábitos dietéticos generales de los participantes. Para evaluar el consumo de té verde, té negro y café, se utilizó una escala de puntuación del 0 al 5: 0 = no consume; 1 = consume muy poco, no a diario; 2 = consume poco, a diario pero menos de 1/4 L; 3 = consumo moderado, entre 1/4 y 1/2 L diario; 4 = alto, más de 1/2 L diario; 5 = muy alto, más de 1 L diario.

Adicionalmente, se aplicó una escala del 0 al 5 para evaluar el consumo de frutas, vegetales, lácteos, dulces y pasteles: 0 = ninguno al día; 1 = una unidad diaria; 2 = dos unidades diarias; 3 = tres unidades diarias; 4 = cuatro unidades diarias; 5 = cinco unidades diarias.

Una vez que el voluntario aceptó participar, firmó el consentimiento informado y completó el cuestionario, se realizó una inspección visual de la cavidad oral para confirmar la ausencia de patologías bucales evidentes. Posteriormente, se procedió a la recolección de la muestra de saliva mediante un método no estimulado,

asegurando un volumen mínimo de 3 ml, que fue almacenado en un tubo Falcon y conservado para su análisis posterior (Bellagambi et al., 2020).

6.8. Extracción de ADN y preparación de bibliotecas de secuenciación.

Una vez recolectadas, las muestras de saliva fueron almacenadas a -80 °C para preservar su integridad. Se ha demostrado que el almacenamiento congelado de las muestras no afecta significativamente las proporciones de las Amplicones (ASVs) detectadas, garantizando así la estabilidad de las mismas (Sierra et al., 2020).

La extracción de ADN a partir de las muestras de saliva se realizó con el kit de extracción de ADN ZymoBIOMICS™ (Zymo Research, 2023), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante (Anexo 11.5). La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo con el espectrofotómetro de microvolúmenes DeNovix DS-11FX, utilizando 1 µl de muestra para la medición. La cuantificación se basó en la absorbancia a 260 nm, y los cálculos fueron realizados automáticamente por el equipo. Además, se registró la relación OD 260/280 como un estimativo del contenido de proteínas en las muestras, donde un rango entre 1.8 y 2.0 indica una muestra compuesta predominantemente por ADN, lo que refleja una cuantificación confiable.

Las muestras de ADN extraído fueron secuenciadas por NovoGene a través de su servicio de Amplicon Metagenomics (WOBI). Para la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA se emplearon los primers 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT). La secuenciación se realizó utilizando la plataforma NovaSeq de Illumina, con una longitud de lectura de 250 nucleótidos (nt). El procedimiento de secuenciación fue del tipo “paired-end”, lo que implica que ambas extremidades de los fragmentos amplificados fueron leídas para obtener una mayor precisión en la secuencia. Tanto la amplificación como la secuenciación fueron realizadas por el personal especializado de NovoGene.

6.9. Control de calidad y sesgos

La elaboración de perfiles comunitarios permitió realizar comparaciones en la composición de la microbiota entre los diferentes grupos del estudio (Rausch et al., 2019). Aunque estos perfiles revelan qué bacterias están presentes en la comunidad oral, no proporcionan información sobre las interacciones entre las bacterias y el huésped o entre las mismas bacterias.

Una de las principales limitaciones de los métodos de perfilado es que no cuantifican la carga bacteriana total. Los resultados se presentan en tablas que muestran el número de secuencias correspondientes a taxones bacterianos o Amplicones (ASVs) para cada muestra, generalmente expresados como abundancias relativas.

Durante la extracción de ADN, se utilizó un control comunitario mixto (mezcla de ADN de diferentes especies bacterianas en concentraciones conocidas) para verificar la precisión y el correcto funcionamiento del proceso de análisis. Estos controles de rendimiento ayudan a garantizar que los resultados obtenidos reflejen adecuadamente la composición real de la comunidad bacteriana. Las mezclas de ADN genómico de diferentes especies bacterianas en concentraciones conocidas están disponibles comercialmente, y se incluyó un control negativo (agua estéril sin ADN) para identificar posibles contaminaciones (Segata et al., 2012).

6.10. Análisis de los datos

Los datos sin procesar obtenidos mediante la secuenciación con la plataforma Illumina fueron analizados utilizando el paquete estadístico DADA2 en R (R Core Team, 2024) , siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores para este tipo de análisis (Callahan et al., 2016). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos “Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2” (McLaren y Callahan, 2021), accesible en <https://zenodo.org/records/4587955>, para la clasificación de secuencias 16S en procariotas.

Como resultado, se generaron tablas de conteos a diferentes niveles taxonómicos

(especie, género, familia y orden) para cada participante (consumidor de yerba mate o no consumidor). A partir de estas tablas, se realizaron análisis estadísticos empleando los paquetes de R phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) y mia (Ernst et al., 2024), los cuales incluyeron el cálculo de abundancias relativas diferenciales, escalamiento multidimensional (MDS), curvas de saturación, entre otros. Estos análisis permitieron identificar especies, géneros, familias y órdenes que estaban diferencialmente representados entre consumidores y no consumidores de yerba mate, con sus respectivos niveles de significancia estadística ($p < 0,05$).

El análisis de diversidad se realizó utilizando diferentes índices:

Índice de Shannon: También conocido como entropía de Shannon, es una medida de la diversidad dentro de una comunidad que considera tanto el número de especies (riqueza) como la equidad o proporción relativa de cada una. A diferencia de otros índices, como el de Chao1, el índice de Shannon tiene en cuenta la abundancia de cada especie, no solo la cantidad de especies presentes.

Índice de Chao1: Es una índice es una medida para estimar la riqueza de especies en una comunidad. Es particularmente útil cuando hay especies raras que no se detectan fácilmente en el muestreo, ya que tiene en cuenta tanto el número de especies observadas como el número de especies que solo se observan una o dos veces (especies raras).

7. RESULTADOS

7.1. Datos demográficos

A partir del cuestionario aplicado a los 104 participantes iniciales, se recopilaron datos demográficos, información sobre los hábitos de consumo de yerba mate, hábitos dietéticos y ancestría auto-adscripta.

De los datos obtenidos de la encuesta ($n = 104$), 78 participantes eran mujeres y 26 eran hombres. La edad de los participantes se distribuyó en un rango de 18 a 37

años, observándose valores medios similares entre ambos sexos. Sin embargo, el grupo de mujeres mostró una mayor variabilidad en la edad (Fig. 1a).

En cuanto al índice de masa corporal (IMC), los valores se encontraron en un rango de 16 a 44 (Fig. 1b). Tanto en mujeres como en hombres, el intervalo de IMC más frecuente fue de 20 a 22.

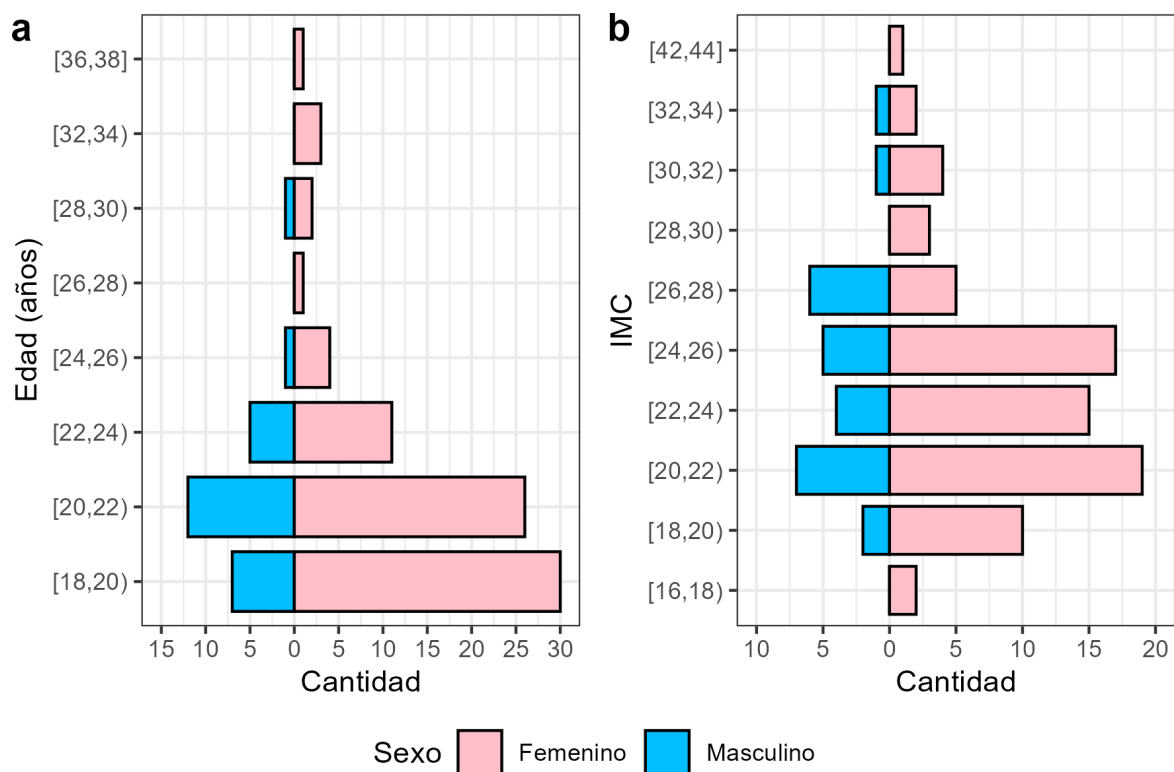


Figura 1. Variables demograficas y antropométricas segmetadas por el sexo de los participantes. a.- Distribución de edad y b.- índice de masa corporal (IMC).

Al registrar la ancestralidad de los participantes según grupos étnicos, se observó que la mayoría tenía ascendencia europea, seguida de ascendencia hispana, y en menor proporción africana y otras ascendencias (Fig. 2). Esta distribución es coherente con la estructura poblacional esperada de la región.

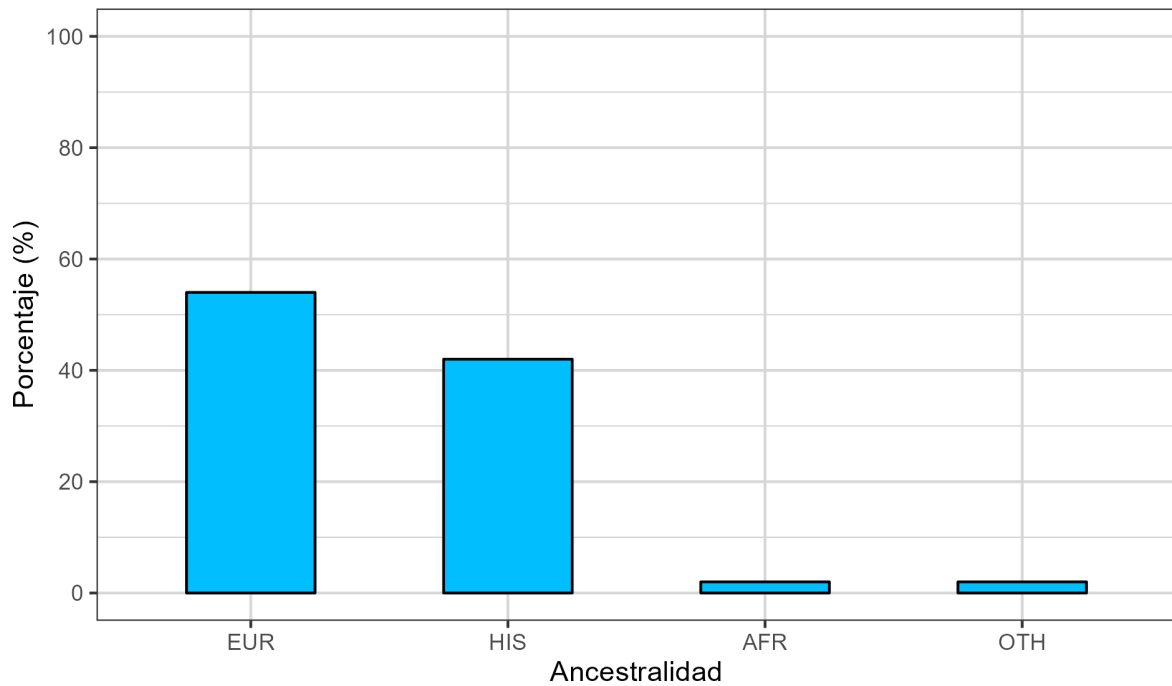


Figura 2. Distribución de la ancestralidad auto-adscrita de los participantes por grupos étnicos.

La figura 3 en la parte a muestra que los consumidores tienen una distribución de edad más amplia, abarcando hasta 36-38 años, mientras que el panel b indica que los no consumidores se concentran principalmente en edades jóvenes (18-22 años). En ambos grupos, predominan las mujeres (rosa) sobre los hombres (azul).

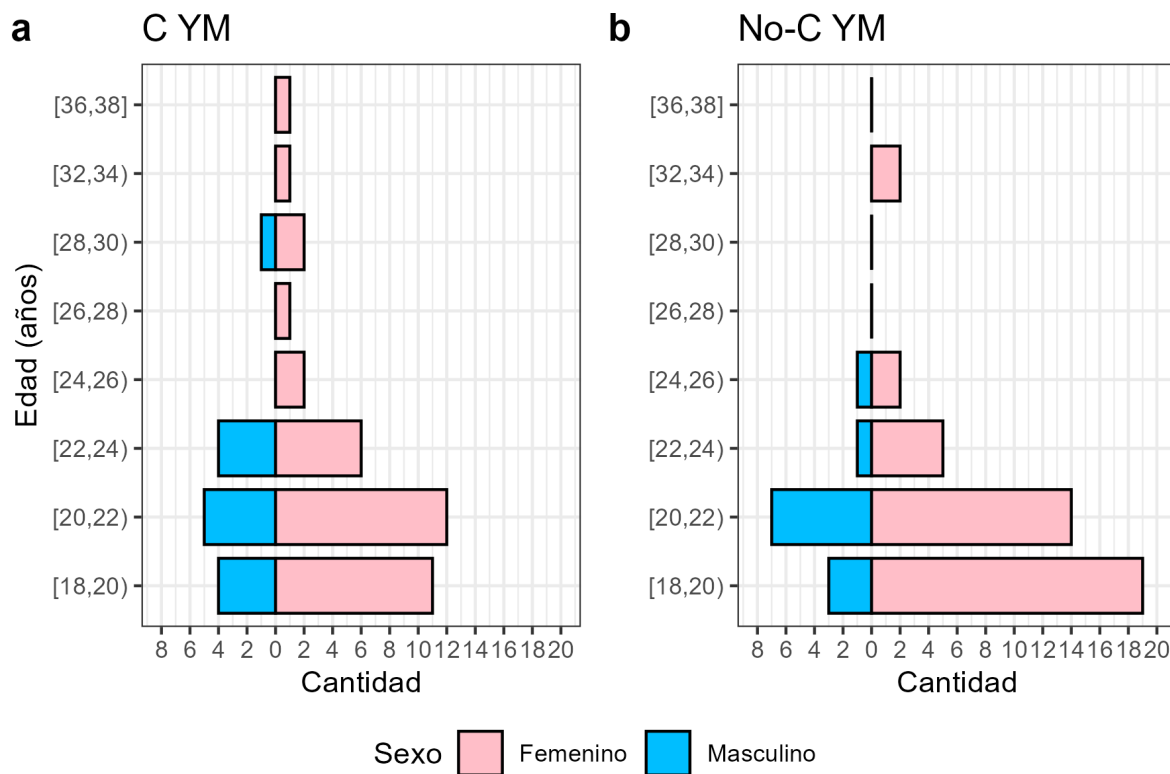


Figura 3. Distribución de la edad y sexo entre consumidores (C YM) y no consumidores (No-C YM) de yerba mate.

Se analizaron marca y tipo de los hábitos de consumo de yerba mate incluyendo la marca preferida (Fig. 4a) y el tipo de yerba consumida (Fig. 4b). La marca Canarias fue la más adquirida, representando el 40% de las preferencias de los consumidores. En cuanto al tipo de yerba, las opciones Orgánica (24%) y Sin Palo (37%) fueron las más populares entre los participantes.

La mayoría de los consumidores (68%) prefieren beber el mate con agua caliente (Fig. 4c), mientras que un 84% no utiliza plantas medicinales como aditivos en la bebida (Fig. 4d).

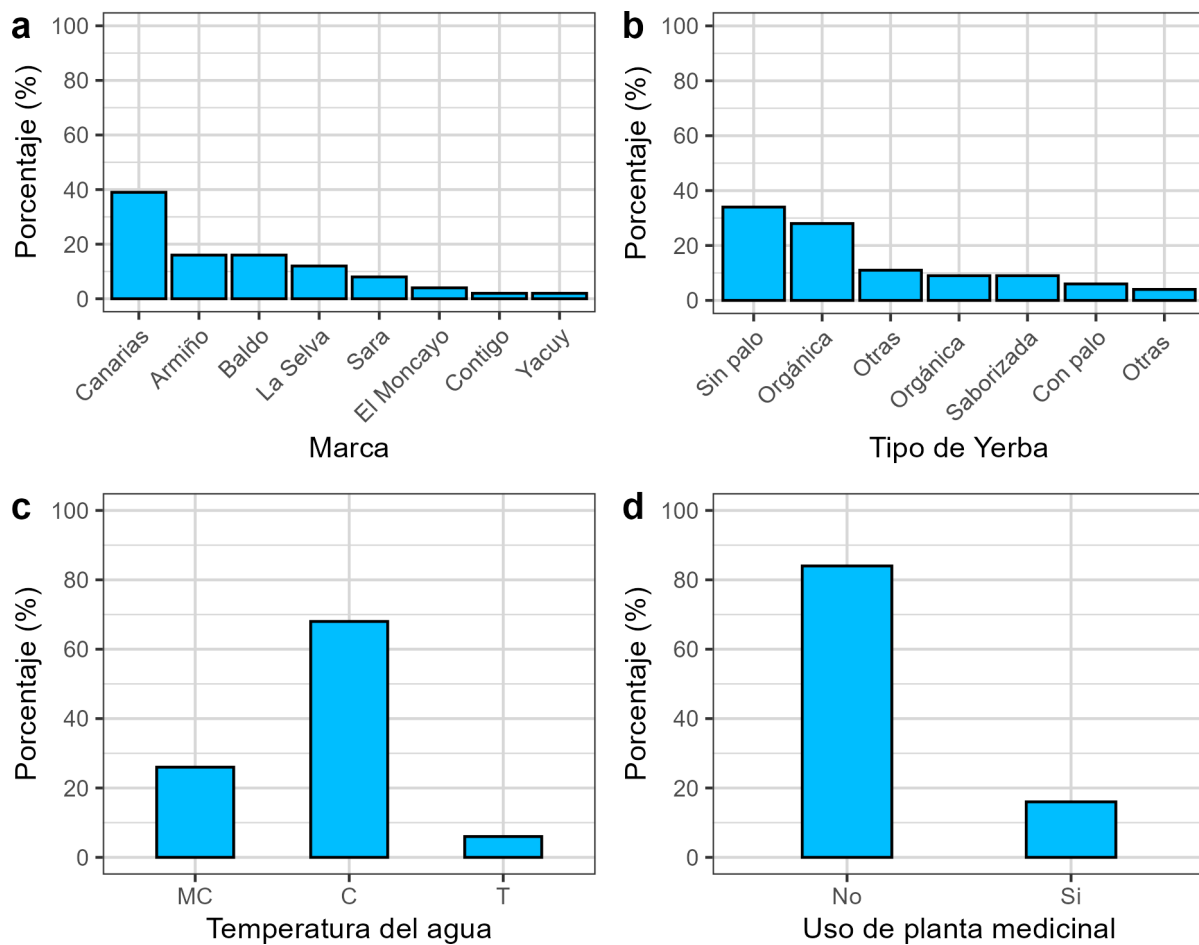


Figura 4. Figura 4. Caracterización de los hábitos de los consumidores de yerba mate. a.- Proporción de la preferencia de marcas comerciales, b.- tipo de yerba, c.- temperatura del agua para la bebida (MC: Muy Caliente, C: Caliente, T: Tibia) y d.- uso de planta medicinal.

En la Fig. 5 se representan los hábitos de consumo de bebidas de los participantes. La mayoría de los encuestados indicaron que beben agua entre 3 a 4 veces al día, La mayoría de los participantes no ingieren té verde, té negro ni probióticos, como se observa en las Figuras 5b, 5c, y 5e. En cuanto al consumo de café, las respuestas fueron más equilibradas con un 19% de participantes que no beben café y un 22% que lo consumen con frecuencia intermedia (Fig. 5d).

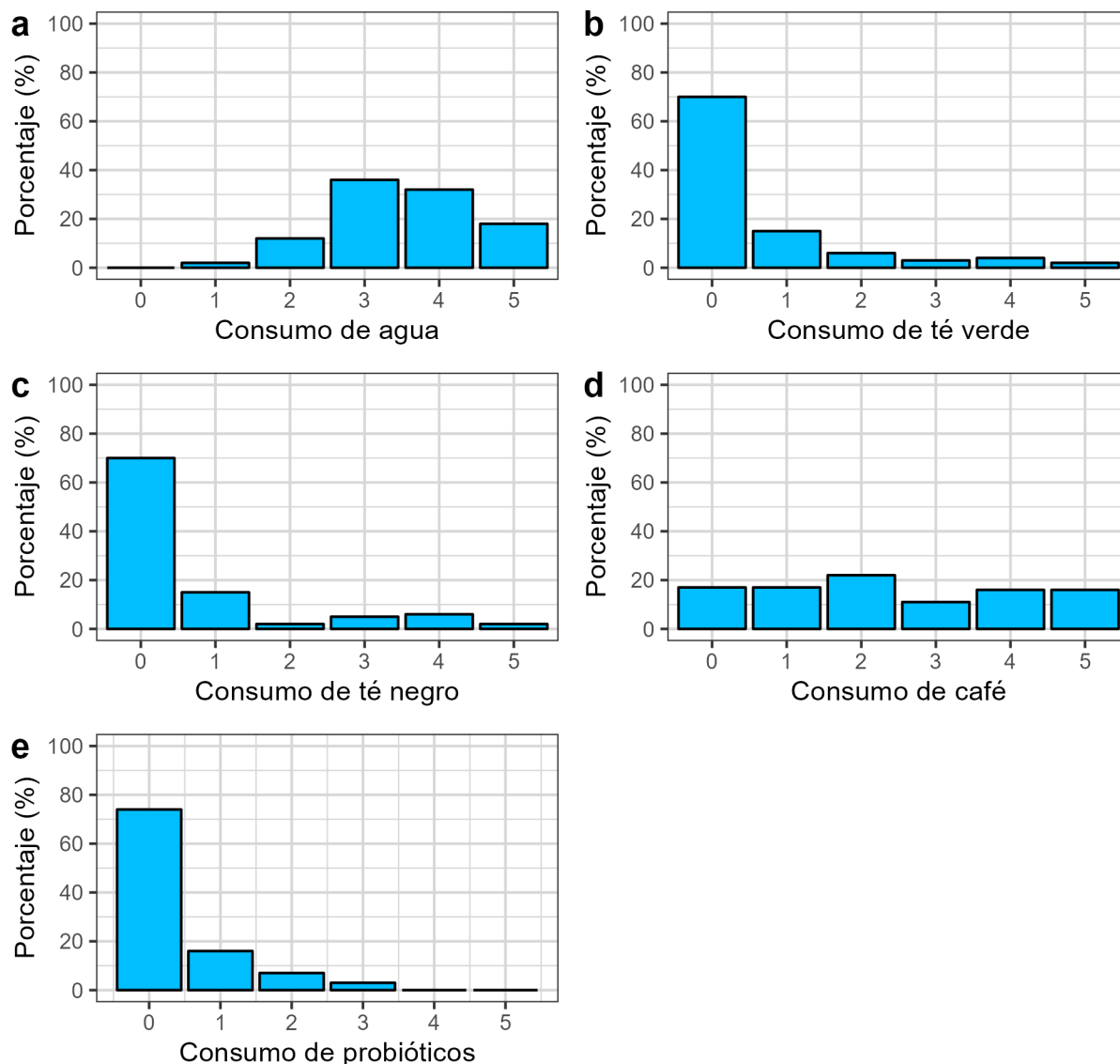


Figura 5. Frecuencia de consumo de bebidas por los participantes. a.- Agua, b- té verde, c.- té negro, d.- café y e.- probióticos.

Se observó en los participantes que en sus dietas el consumo de comida frita fué entre muy bajo y bajo (Fig. 6a), el consumo de frutas es entre moderado y muy bajo (Fig. 6b), el consumo de verduras y vegetales es moderado a alto (Fig. 6c). Por su parte, el consumo de dulces, bizcochos y lácteos por parte de los participantes es de moderado a alto (Fig. 6 d,e,f).

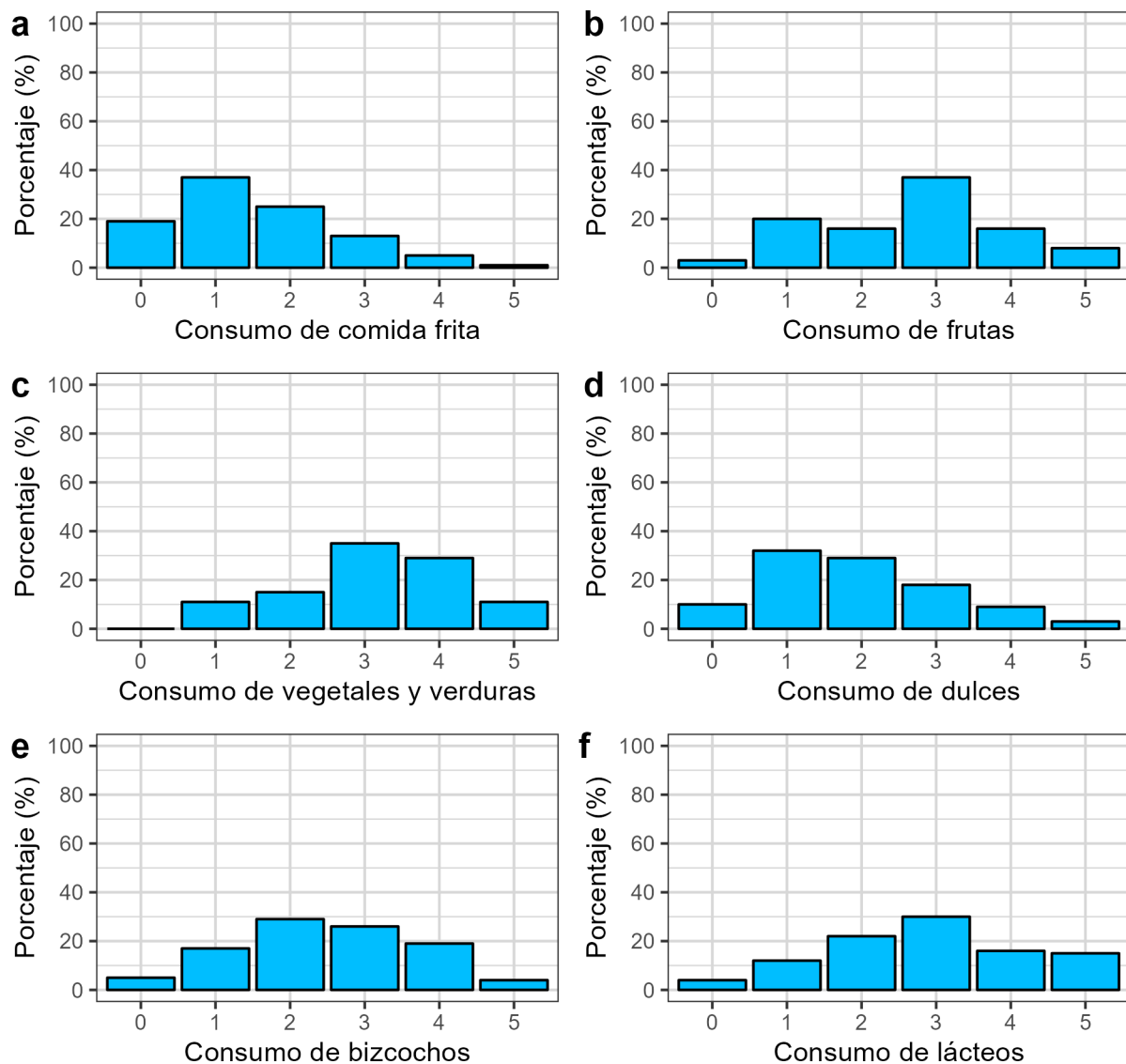


Figura 6. Frecuencia de consumo de alimentos por los participantes. a.- Comida frita, b.- frutas, c.- vegetales y verduras, d.- dulces, e.- bizcochos y f.- lácteos.

Al estudiar los hábitos de higiene personal se encontró que el 60% de los encuestados se cepillaba 3 veces al día y un 25% lo hacía en más de tres ocasiones y 15% lo hacía en dos oportunidades (Fig. 7).

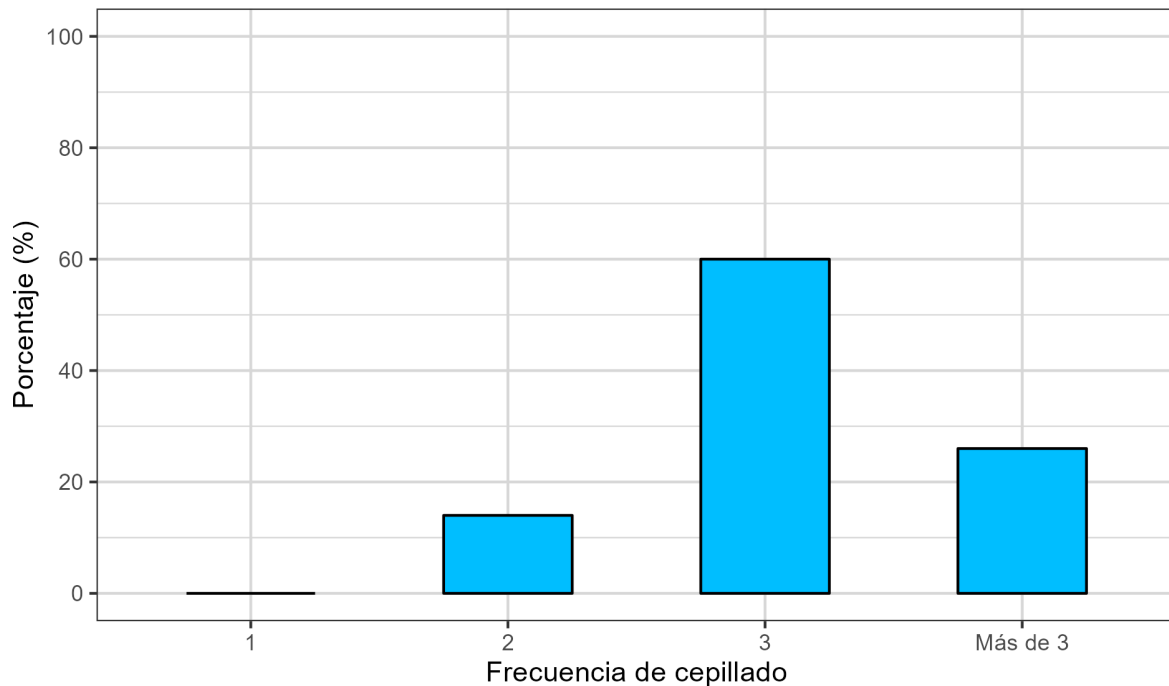


Figura 7. Frecuencia de cepillado de los participantes.

Con respecto al consumo de fármacos se encontró un 74% no consumía ninguno, del 26% que sí lo hacía se registraron medicación para tiroides, anticonceptivos y un participante consumía antidepresivos. Dentro de las enfermedades registradas COVID-19 resultó la más frecuente con un 46% en los participantes, mientras que solo se registraron 2 pacientes con enfermedades autoinmune y otros 2 con Enfermedades gastrointestinales como se observa en la Tabla 1. Siendo COVID-19 una de las enfermedades que se preguntó directamente.

Tabla 1. Porcentaje en el consumo de fármacos y prevalencia de enfermedades en los participantes.

	Si (%)	No (%)
Uso de fármacos	26	74
Covid-19 (2020 - 2022)	46	54
Cáncer	0	100
Neuropatías	0	100
Enfermedad autoinmune	2	98
Diabetes	0	100
Enfermedad gastrointestinal	2	98

Se logró cumplir con el primer objetivo específico del estudio, que consistía en describir los hábitos de consumo e higiene bucal de la población estudiada. A través del análisis de los datos recolectados, se identificaron patrones claros en la frecuencia de consumo de diferentes bebidas, alimentos y rutinas de higiene oral, permitiendo caracterizar y comparar las prácticas diarias entre los consumidores y no consumidores de yerba mate.

7.2. Extracción de ADN y secuenciación del gen 16S

La Tabla 2 contiene los resultados de la concentración de ADN (> 2 ng/ul) y la densidad óptica (OD) 260/280 de la saliva de los participantes, separados en consumidores y no consumidores de yerba mate. De las 104 muestras, únicamente 53 fueron secuenciadas, de las cuales 25 correspondieron a consumidores de yerba mate y 28 a no consumidores.

Tabla 2. Resumen de la cantidad del ADN en las muestras secuenciadas.

Muestra	Consumidor YM	Sexo	Concentración (ng/ul)	Abs 260/280
SS_A	No-C YM	F	29,8	1,91
SS_B	No-C YM	F	30,8	2
SS_C	No-C YM	F	5	2
SS_D	No-C YM	F	8	1,7
SS_E	No-C YM	M	22,14	1,6
SS_F	No-C YM	F	44	1,8
SS_G	No-C YM	M	20	1,6
SS_H	No-C YM	F	17	1,83
SS_I	No-C YM	F	31,8	1,91
SS_J	No-C YM	F	21,3	1,97
SS_K	No-C YM	F	32,7	1,84
SS_L	No-C YM	F	2	SD
SS_M	No-C YM	F	18,7	1,6
SS_N	No-C YM	M	42,5	1,84
SS_O	No-C YM	F	10,5	1,75
SS_P	No-C YM	M	69,4	1,5
SS_Q	No-C YM	F	28,9	1,7

SS_R	No-C YM	F	36,5	1,8
SS_S	No-C YM	F	22	1,76
SS_T	No-C YM	M	2	1,7
SS_02	No-C YM	F	SD	SD
SS_16	No-C YM	M	27.3	1.84
SS_22	No-C YM	F	20.3	1.71
SS_26	No-C YM	F	18.5	1.60
SS_30	No-C YM	F	11.35	1.51
SS_34	No-C YM	M	8.01	1.66
SS_38	No-C YM	F	30.5	1.75
SS_42	No-C YM	F	11.06	1.63
SS_aa	C YM	M	12	1,66
SS_bb	C YM	F	13	1,8
SS_U	C YM	M	8,7	1,74
SS_V	C YM	F	11,6	1,7
SS_W	C YM	F	5	1,63
SS_X	C YM	F	21,5	1,5
SS_Y	C YM	F	11	1,09
SS_Z	C YM	M	49	1,83
SS_01	C YM	F	73,8	1,9
SS_09	C YM	M	49.8	1.80
SS_13	C YM	F	4.417	2.00
SS_15	C YM	F	44.5	1.85
SS_19	C YM	F	6.62	1.88
SS_21	C YM	F	25.5	1.43
SS_23	C YM	M	18.2	1.79
SS_25	C YM	M	50.33	1.77
SS_27	C YM	M	23.7	1.76
SS_29	C YM	M	20.3	1.73
SS_31	C YM	F	21.63	1.70
SS_37	C YM	F	43.9	1.89
SS_39	C YM	M	18.9	1.50
SS_45	C YM	F	38.2	1.67
SS_47	C YM	F	14.17	1.38
SS_49	C YM	F	25.7	1.66
SS_51	C YM	F	15.9	1.58

Para la detección de Amplicon Sequence Variants (ASVs), las lecturas obtenidas fueron procesadas con DADA2, siguiendo el tutorial recomendado por los autores (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>). El script utilizado para la detección de ASVs a partir de las lecturas crudas proporcionadas por NovoGene se detalla en el Anexo 11.7.

El procesamiento con DADA2 involucró varias etapas importantes. Primero, se realizó un filtrado de calidad, eliminando las lecturas con baja calidad y recortando las secuencias en posiciones específicas para asegurar que solo se mantuvieran fragmentos de alta calidad. Luego, se aplicaron algoritmos de corrección de errores que permitieron distinguir entre las variantes verdaderas y los errores introducidos durante la secuenciación, mejorando así la precisión del análisis.

A continuación, las lecturas provenientes de ambos extremos del fragmento de ADN fueron unidas (paired-end) para formar secuencias completas, siempre que la superposición entre ellas fuera suficiente para garantizar la coherencia de la secuencia. Posteriormente, se realizó la eliminación de quimeras, que permitió identificar y remover secuencias quiméricas (artefactos generados durante la amplificación), asegurando que solo se conservaran las secuencias auténticas. Finalmente, las secuencias procesadas fueron agrupadas y asignadas a ASVs, permitiendo la identificación y cuantificación precisa de variantes específicas a nivel de una sola mutación.

A partir de las 53 muestras secuenciadas, se obtuvo un promedio de 204,719 lecturas por muestra, que tras el preprocesamiento fueron asignadas a un promedio de 137,565 lecturas por muestra (Anexo 11.6). Este riguroso proceso de análisis asegura que las variantes identificadas sean precisas y confiables para el estudio de la microbiota.

7.3. Análisis de las comunidades microbianas en la saliva de consumidores y no consumidores de yerba mate

En total, se obtuvo un promedio de 204,719 lecturas por muestra después de la secuenciación. La Figura 8 muestra la comparación de la abundancia total de

lecturas secuenciadas entre consumidores y no consumidores de yerba mate. En a se presenta la abundancia de amplicones para cada muestra individual. Se observa variabilidad en el número de secuencias entre las muestras, pero no se aprecia una diferencia clara entre los dos grupos.

En b compara la abundancia promedio de lecturas entre los dos grupos utilizando boxplot. Para evaluar si existían diferencias significativas entre las medias de ambos grupos, se realizó una prueba t de Welch, que resultó en un p-valor de 0.24, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de lecturas entre los consumidores y no consumidores de yerba mate. Esto significa que, en promedio, ambos grupos tienen una cantidad similar de secuencias de ADN, sin diferencias notables.

Para los no consumidores de yerba mate, el número de ASVs osciló entre 278 y 599. En el caso de los consumidores, se observó una mayor variabilidad, con un rango de ASVs de entre 174 y 770.

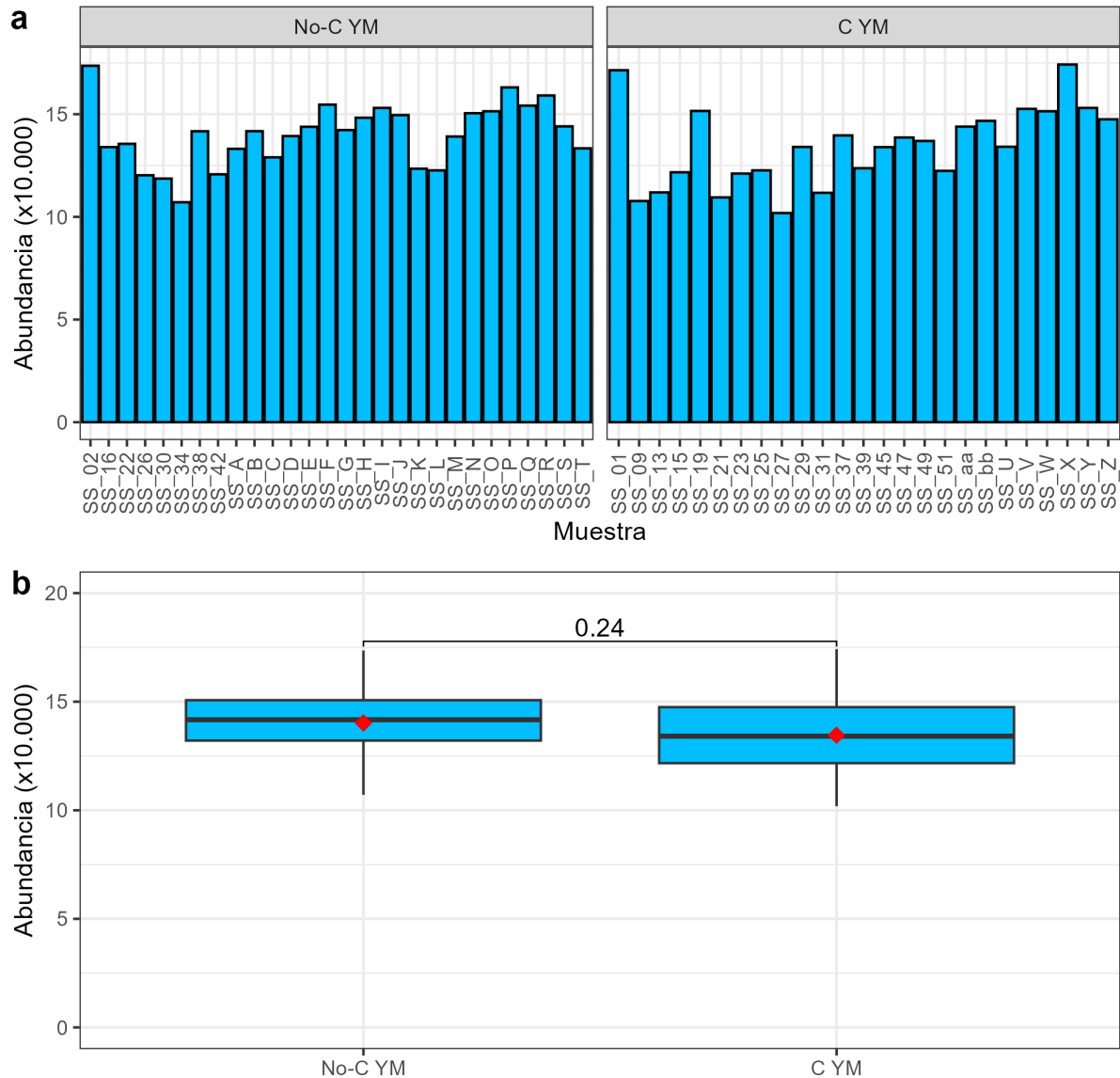


Figura 8. a.- Abundancia de lecturas por muestra, b.- Boxplot de la abundancia de lectura por grupo.

En la Figura 9 se presenta el número ASVs detectadas por muestra en los grupos de consumidores (C YM) y no consumidores de yerba mate (No-C YM). En la gráfica superior (9a), se observa el número de ASVs en cada muestra individual, donde los consumidores de yerba mate presentan una mayor variabilidad en el número de ASVs. En 9b muestra la comparación de los valores promedio de ASVs entre ambos grupos. En promedio, el grupo de consumidores de yerba mate presentó un mayor número de ASVs (media \pm desviación estándar: 476 ± 140 ASVs) en comparación con el grupo de no consumidores (372 ± 71 ASVs), y esta diferencia fue

estadísticamente significativa ($p = 0.03$). Esto sugiere que el consumo de yerba mate podría estar asociado con una mayor diversidad de variantes de secuencias microbianas en la microbiota salival en este grupo estudiado.

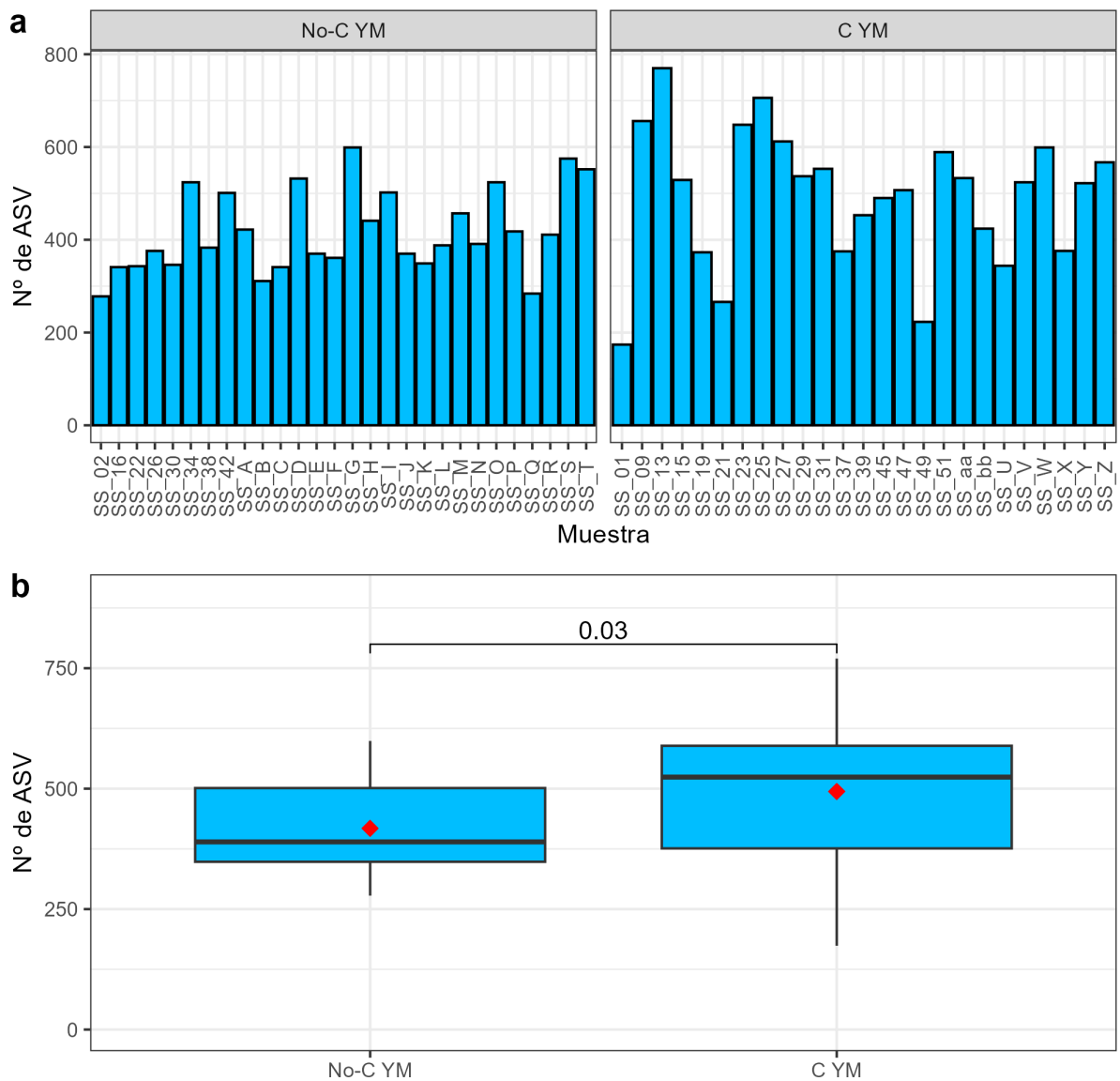


Figura 9. a.- Comparación del número de ASVs entre consumidores y no consumidores de yerba mate. (a) Número de ASVs detectado en cada muestra individual en los grupos. (b) Comparación de los valores promedio de ASVs entre los dos grupos

La gráfica de rango-abundancia de amplicones (Figura 10) permite evaluar la riqueza y la distribución de ASVs en la microbiota salival, con el eje horizontal mostrando el rango de abundancia y el eje vertical representando la abundancia

relativa acumulada. Las curvas reflejan cómo se distribuyen las ASVs, y las pendientes proporcionan información sobre la equidad en las comunidades microbianas. En ambas curvas, se observa una tendencia similar, lo que sugiere que tanto consumidores como no consumidores de yerba mate presentan una comunidad diversa y equilibrada. La similitud en las formas de las curvas indica que no hay diferencias marcadas en la dominancia de taxones entre los dos grupos, sugiriendo una distribución equitativa de ASVs en ambos.

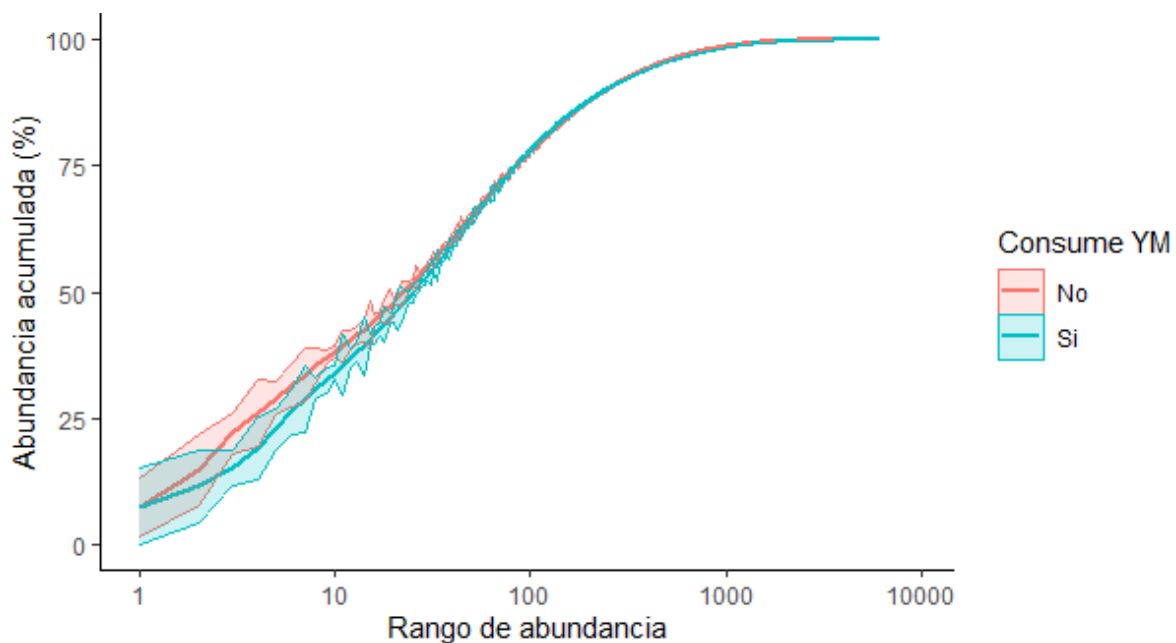
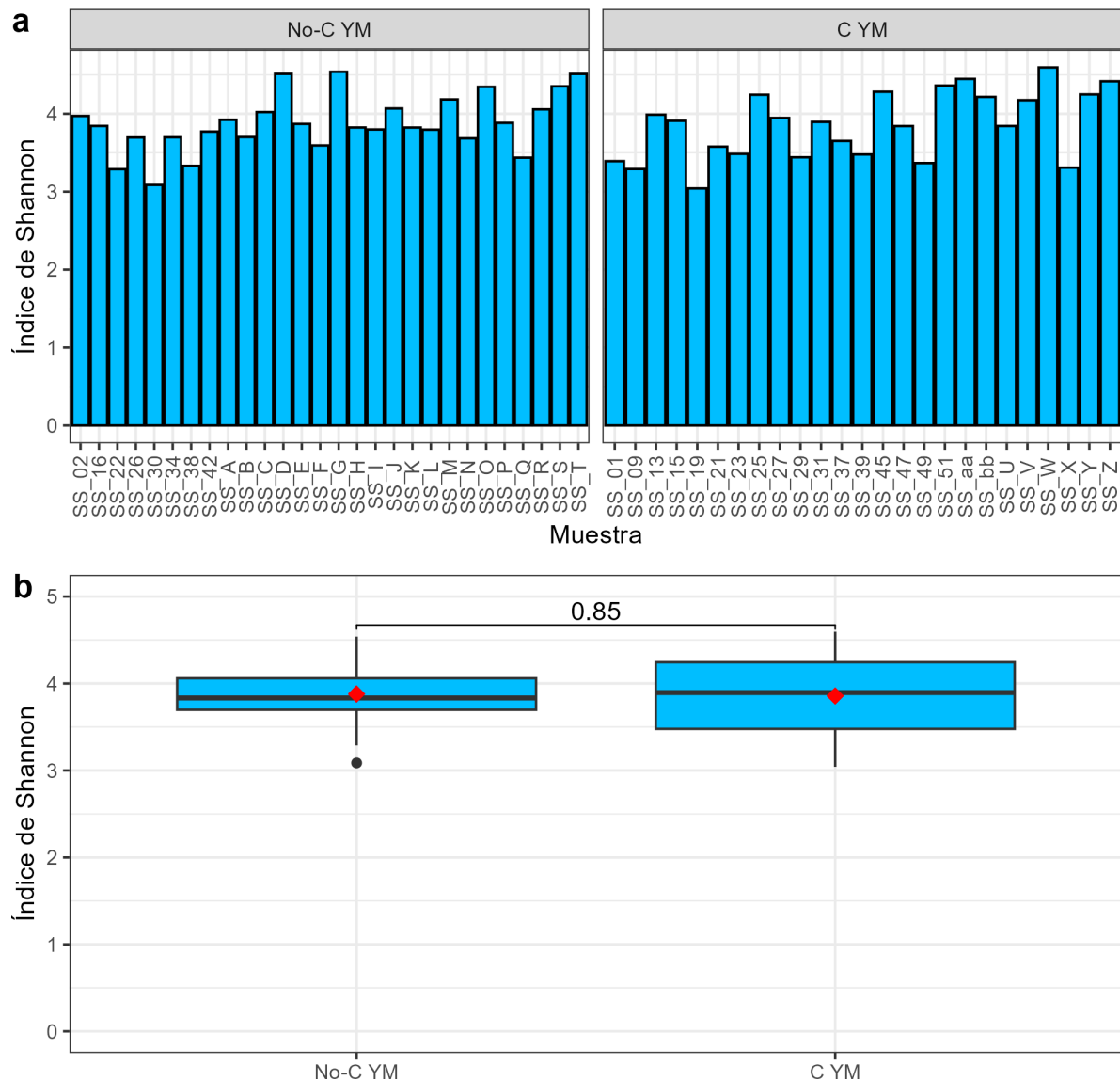


Figura 10. Curva acumulativa de amplicones (ASVs). El eje X corresponde al rango de acuerdo a la abundancia relativa de los amplicones. El eje Y corresponde a la abundancia relativa acumulada a medida que se van incluyendo amplicones.

La Figura 11 muestra la distribución de abundancias relativas medida mediante el Índice de Shannon. En la figura 11a se observa la diversidad de cada muestra individual. Los no consumidores presentan valores relativamente constantes, con la mayoría de las muestras con valores de entre 3.0 y 4.0. En los consumidores, hay una mayor variabilidad, con valores que oscilan entre 3.0 y 4.5. En 11b se comparan las medianas de la diversidad entre ambos grupos con boxplot. Aunque los

consumidores muestran una amplitud más amplia en la diversidad, la prueba estadística realizada indicó que no hay diferencias significativas en la diversidad microbiana entre consumidores y no consumidores de yerba mate, con un p-valor de 0.85.



especies (índice Chao1) para cada muestra individual, diferenciando entre consumidores de yerba mate (C YM) y no consumidores (No-C YM). En general, las barras muestran la variabilidad de la riqueza en cada grupo. La parte inferior (b) compara la riqueza media estimada entre los grupos de consumidores y no consumidores de yerba mate. Se observó una mayor mediana de riqueza en los consumidores de yerba mate, con una diferencia significativa ($p = 0.03$) entre ambos grupos, sugiriendo que el consumo de yerba mate podría estar asociado a una mayor riqueza de especies microbianas en la microbiota salival.

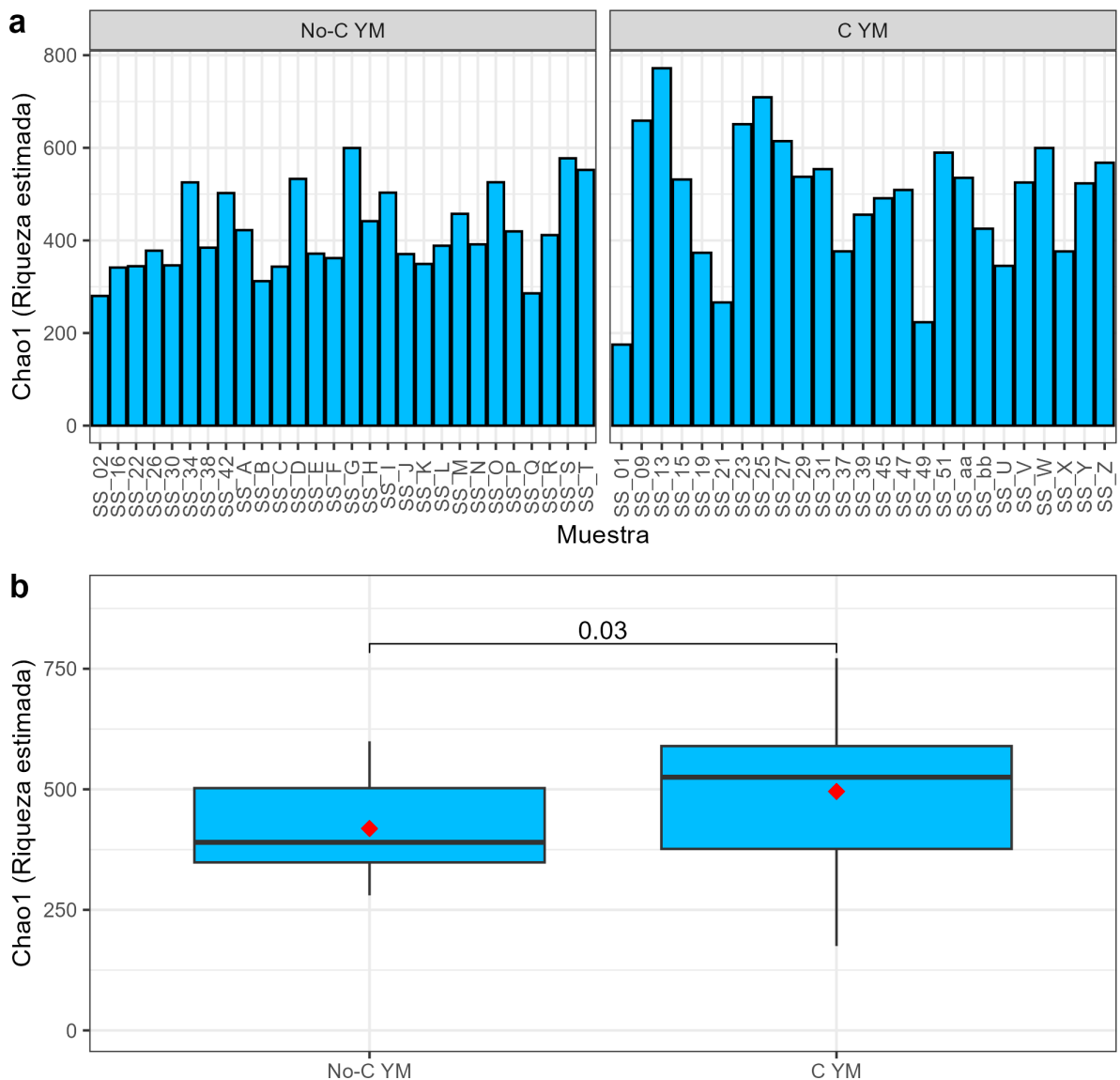


Figura. 12. Comparación de la riqueza estimada de especies (índice Chao1) en consumidores y no consumidores de yerba mate. a - Riqueza estimada de especies para cada muestra. b - Comparación de la riqueza media estimada entre los grupos.

Las lecturas obtenidas se clasificaron en distintos niveles taxonómicos (reino, filo, clase, orden, familia, género y especie) utilizando la base de datos de referencia Silva 138.1. Como se muestra en la Tabla 3, el porcentaje de lecturas clasificadas fue alto en los niveles superiores, particularmente hasta el nivel de género, con menos del 1% de las lecturas sin clasificar entre los niveles de reino y género. Sin embargo, a nivel de especie, aproximadamente el 32% de los ASVs no se pudieron clasificar debido a limitaciones en la resolución taxonómica. Estos resultados reflejan una clasificación confiable en los niveles superiores, lo cual es favorable para el análisis detallado de la microbiota salival.

Tabla 3. Promedio de los porcentajes de lecturas clasificados en cada nivel taxonómico, desviación estándar de los porcentajes y porcentaje de reads no clasificados.

Nivel taxonómico	Promedio clasificado (%)	Desviación estándar (%)	Porcentaje no clasificado (%)
Reino	99.99965	0.00094	0.00035
Filo	99.97922	0.03779	0.02078
Clase	99.97785	0.03907	0.02215
Orden	99.96766	0.04195	0.03234
Familia	99.21420	1.37893	0.78580
Género	99.06455	1.70779	0.93545
Especie	67.88754	9.37409	32.11246

La Figura 12 muestra el número de especies microbianas presentes en las muestras. En a se observan gráficos de barras que representan las especies identificadas en cada muestra individual, revelando una tendencia a mayor número de especies en los consumidores de yerba mate.

En b presenta un boxplot que resume las diferencias en el número de especies entre los dos grupos. El análisis estadístico mediante la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney indicó una diferencia significativa ($p = 0.0036$), sugiriendo

que los consumidores de yerba mate tienen una mayor diversidad microbiana en comparación con los no consumidores.

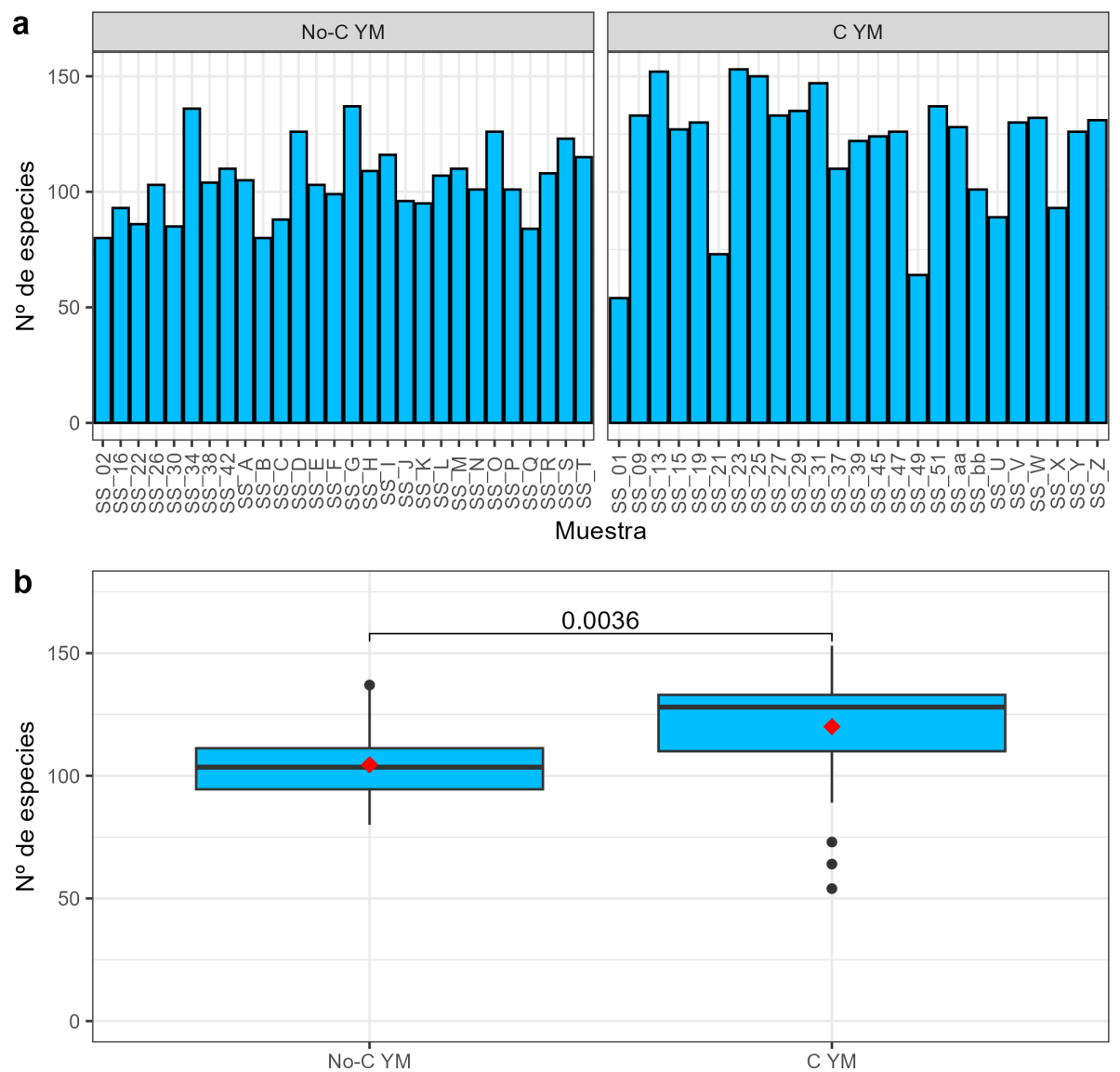


Figura 11. a.- Número de especies por muestra. b.- Boxplot del número de especies por grupo.

La Figura 12 presenta la abundancia relativa de bacterias en las muestras de saliva de consumidores (C YM) y no consumidores (No-C YM) de yerba mate, analizadas en tres niveles taxonómicos: Phylum (a), Clase (b) y Orden (c).

En a: Muestra la distribución a nivel de Phylum, destacando la presencia predominante de Firmicutes, Bacteroidota, y Proteobacteria en ambas categorías. Aunque la abundancia es similar en los dos grupos, se pueden apreciar algunas diferencias sutiles en la proporción relativa. Otros filos como Actinobacteriota y Fusobacteriota aparecen en menor proporción.

En b: Representa la abundancia a nivel de clase. Las clases más destacadas incluyen Bacilli, Bacteroidia, y Gammaproteobacteria. Las diferencias en la representación de estas clases entre consumidores y no consumidores permiten observar ciertas variaciones en la composición microbiana, aunque las tendencias generales se mantienen.

En c: Ilustra la abundancia a nivel de orden. Los órdenes más representativos fueron Bacteroidales, Lactobacillales, y Veillonellales-Selenomonadales, entre otros. Este nivel taxonómico proporciona una visión más detallada de las diferencias en la microbiota salival entre los dos grupos, resaltando algunas variaciones en la abundancia relativa.

En general, la Figura 12 refleja cómo se distribuyen las bacterias en diferentes niveles taxonómicos y permite comparar directamente la composición microbiana, destacando la variabilidad y las similitudes en la abundancia relativa de los grupos bacterianos.

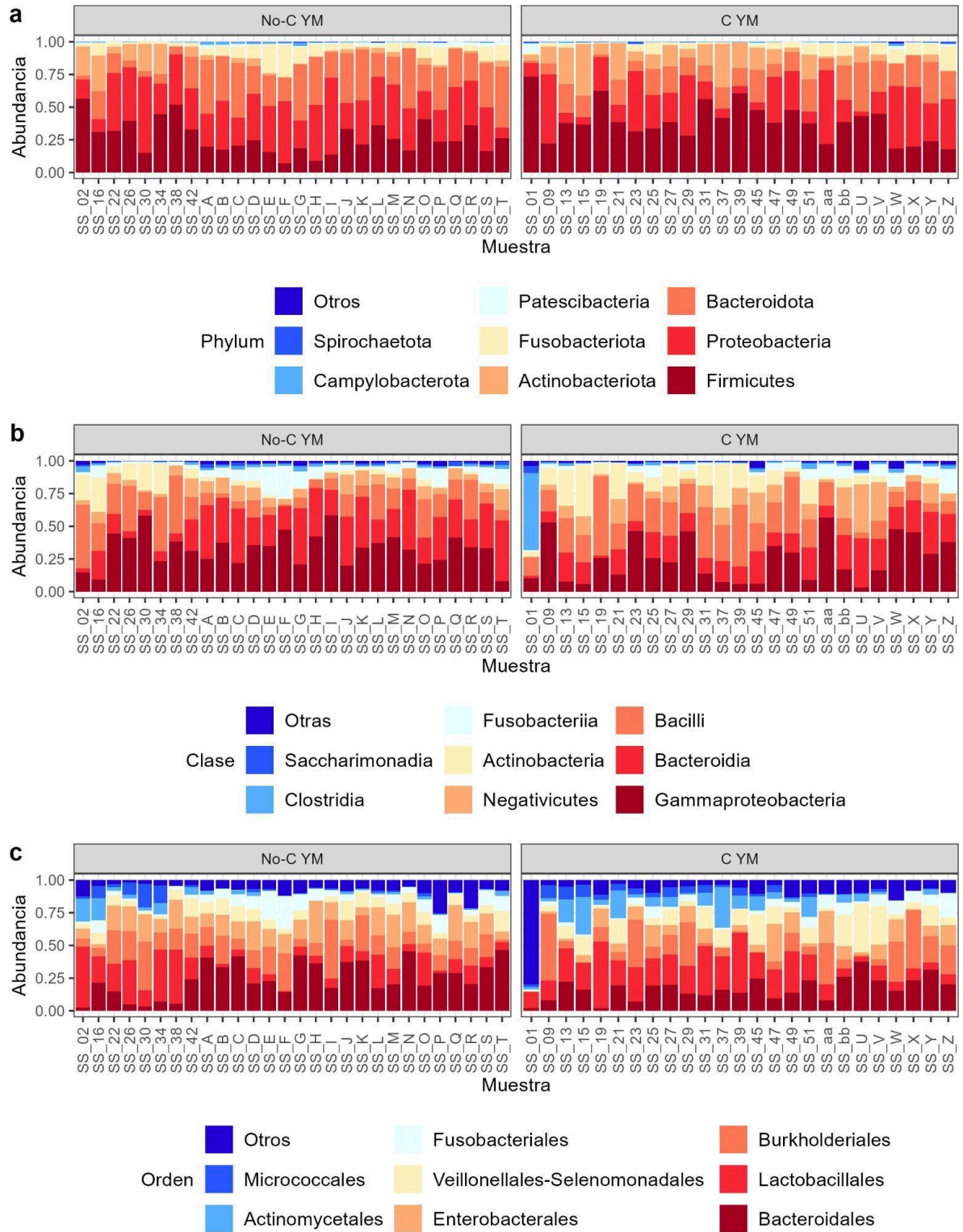


Figura 12. Abundancias relativas de las distintas categorías taxonómicas, a.- Phylum; b.- Clase; c.- Orden. Los colores corresponden a grupos diferentes dentro de su categoría taxonómica.

La Figura 13 presenta gráficas de barras apiladas que muestran las abundancias relativas de las bacterias distribuidas en tres niveles taxonómicos: Familia (a), Género (b) y Especie (c).

En a: Muestra la composición bacteriana a nivel de Familia. Las familias más abundantes en ambas categorías incluyen Streptococcaceae, Prevotellaceae, y Veillonellaceae. Se observa que, aunque ambas muestras comparten estos grupos predominantes, existen diferencias en la proporción relativa, especialmente en la mayor abundancia de Prevotellaceae en los consumidores de yerba mate.

En b: Representa la abundancia a nivel de Género. Los géneros más destacados son *Streptococcus*, *Prevotella*, y *Veillonella*. Se puede notar una diversidad de géneros bacterianos en ambos grupos, pero con algunas variaciones en la proporción de ciertos géneros como *Fusobacterium* y *Porphyromonas*. Las diferencias observadas en estos géneros pueden reflejar las posibles influencias del consumo de yerba mate en la composición de la microbiota salival.

En c: Muestra la composición a nivel de Especie. Este nivel de detalle permite identificar especies específicas dentro de los géneros, tales como *Streptococcus oralis*, *Neisseria mucosa*, y *Prevotella melaninogenica*. A través de este nivel, se observa una variabilidad considerable en la composición específica de las muestras, con especies predominantes que son comunes en ambos grupos pero con variaciones en sus proporciones relativas.

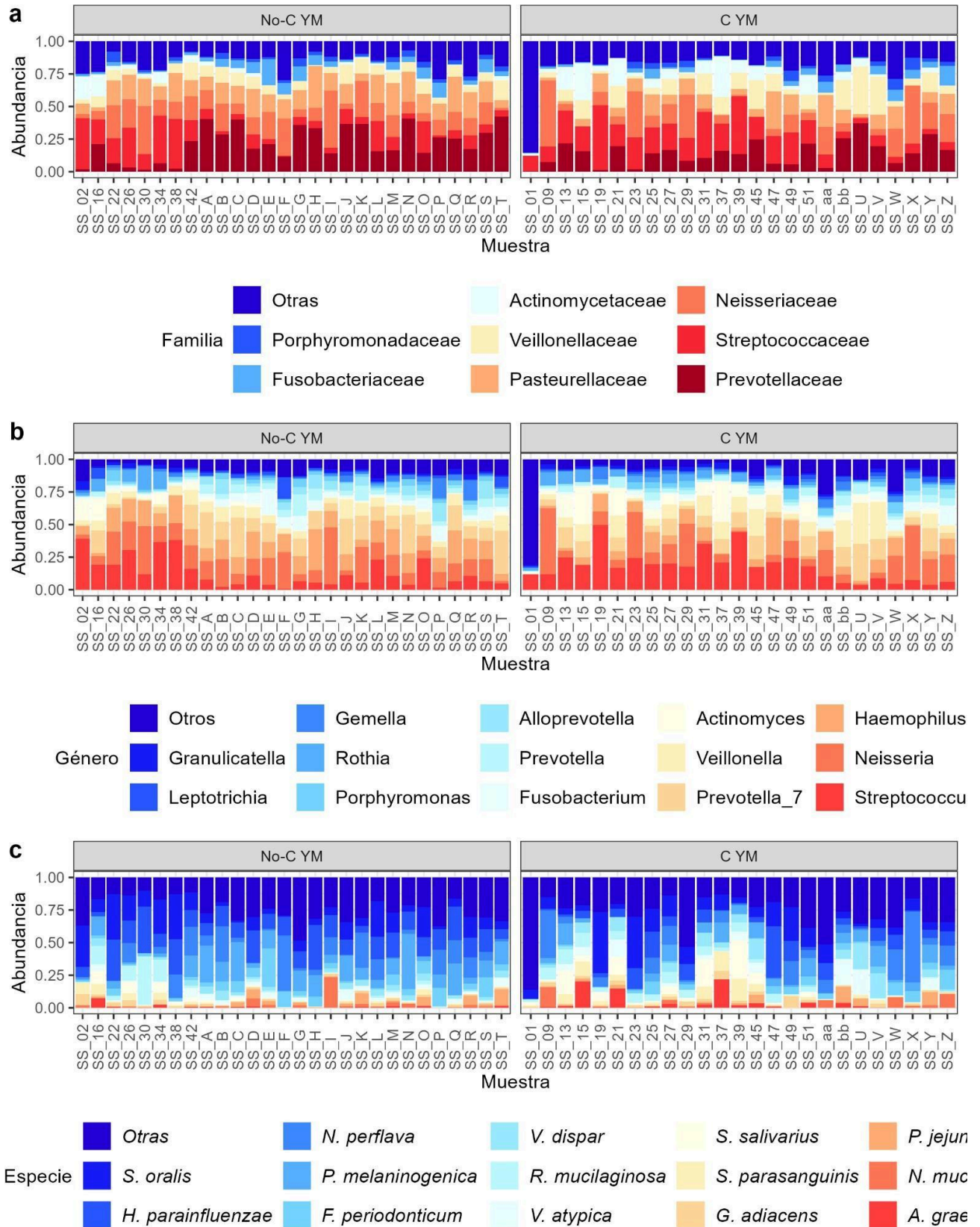


Figura 13. Abundancias relativas de las distintas categorías taxonómicas, a.- Familia; b.- Género; c.- Especie. Los colores corresponden a grupos diferentes dentro de su categoría taxonómica.

La Figura 14 muestra el número de lecturas correspondiente a los géneros bacterianos más frecuentes. El género más abundante es *Streptococcus*, seguido por *Prevotella_7*, ambos con más de 36.000 lecturas. Otros géneros destacados incluyen *Neisseria*, *Actinomyces*, *Veillonella* y *Fusobacterium*, cada uno con numerosas cantidad de lecturas obtenidas.

La figura también destaca la presencia de un número considerable de lecturas que no pudo ser clasificado en un género específico, lo que indica la diversidad microbiana presente en las muestras. A medida que se desciende en la lista, se ve una disminución en el número de lecturas, con géneros como *Rothia*, *Gemella*, *Granulicatella* y *Corynebacterium*, que tienen menos de 10.000 lecturas.

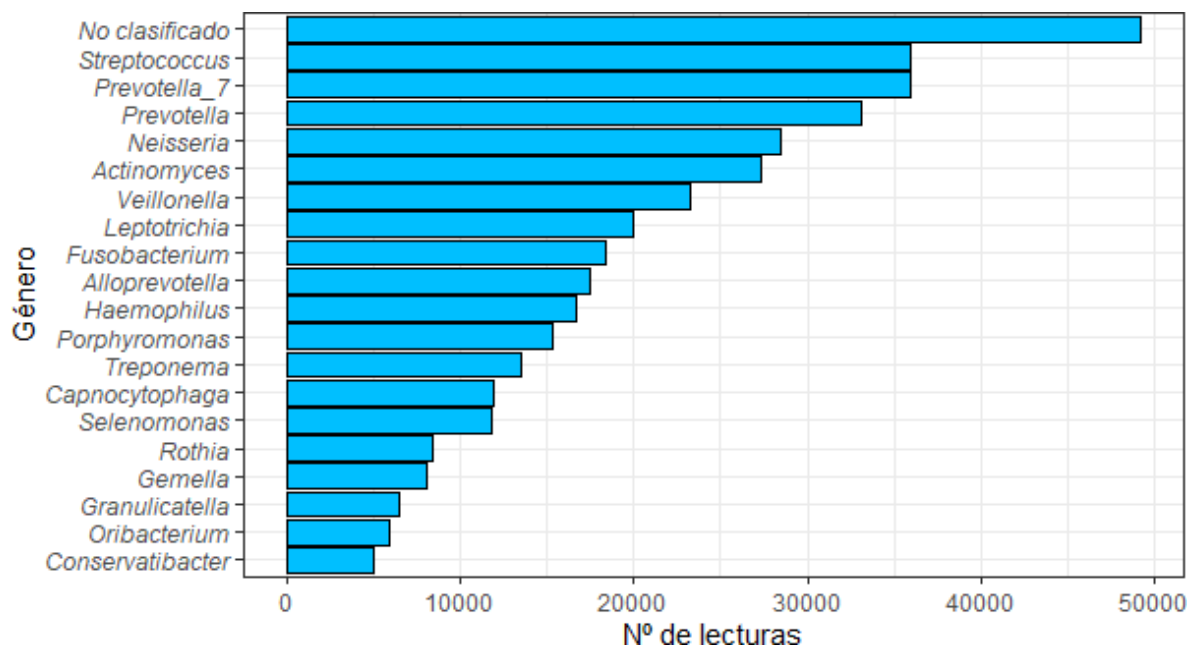


Figura 14. Número de lecturas en los géneros más frecuentes.

En la Figura 15, se representa la abundancia a nivel de los principales géneros. En ambos grupos, el género con mayor abundancia fue *Streptococcus*, encontrando una mayor variabilidad en la abundancia del género en los no consumidores. Por otro lado, en el mismo grupo de no consumidores se observó mayor abundancia de los géneros *Neisseria* y *Haemophilus*. Mientras que los consumidores, se encontró

mayor abundancia del género *Actinomyces*. *Prevotella* presentó mayor abundancia en las muestras de consumidores.

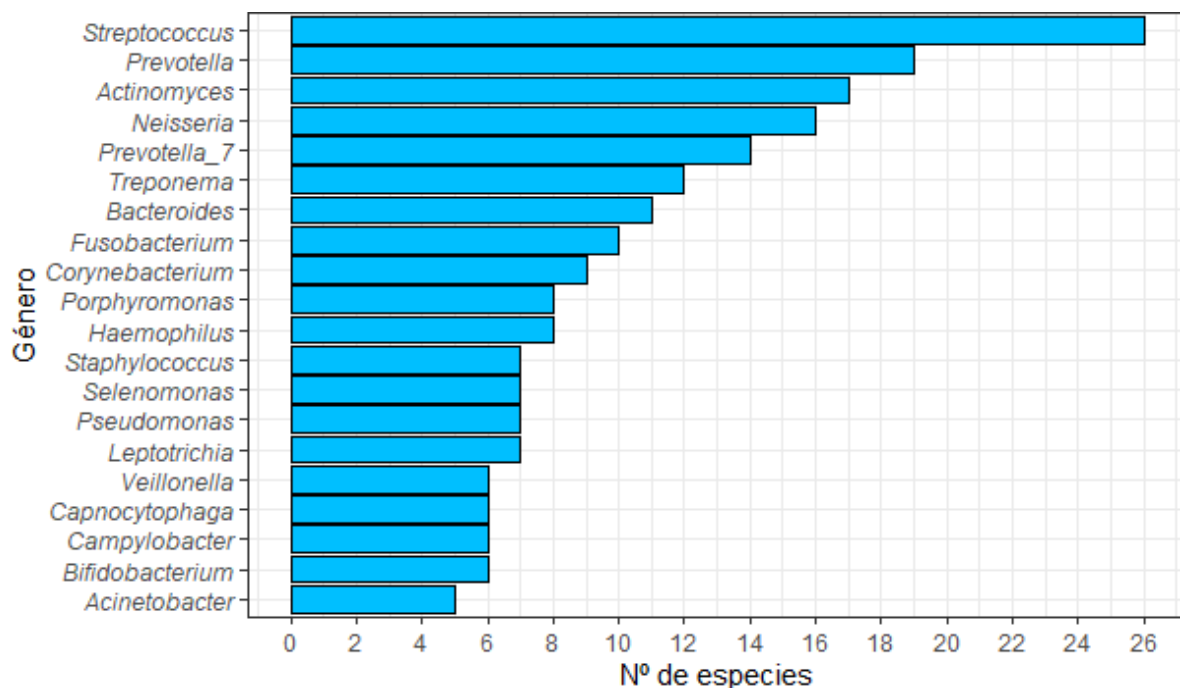


Figura 15. Número de especies en los géneros más frecuentes.

En la Figura 16, se representan las especies bacterianas más abundantes. Las especies más destacadas, por su mayor abundancia y representación en ambas categorías, son *Streptococcus oralis*, *S. salivarius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria perflava*, *Rothia mucilaginosa*, y *Prevotella melaninogenica*. Estas especies son comunes en la microbiota salival y muestran una alta presencia en ambos grupos.

Además, se identificaron otras especies con menor abundancia en las muestras, pero que también forman parte de la composición microbiana general. Estas incluyen *Actinomyces graevenitzii*, *Neisseria subflava*, *N. mucosa*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Prevotella salivae*, *P. jejuni*, *P. histicola*, *P. pallens*, *Streptococcus sanguinis*, *S. parasanguinis*, *Veillonella parvula*, *V. dispar*, y *V. atypica*.

La gráfica permite observar las diferencias en la abundancia relativa de estas especies entre los grupos, evidenciando posibles variaciones que podrían estar asociadas al consumo de yerba mate.

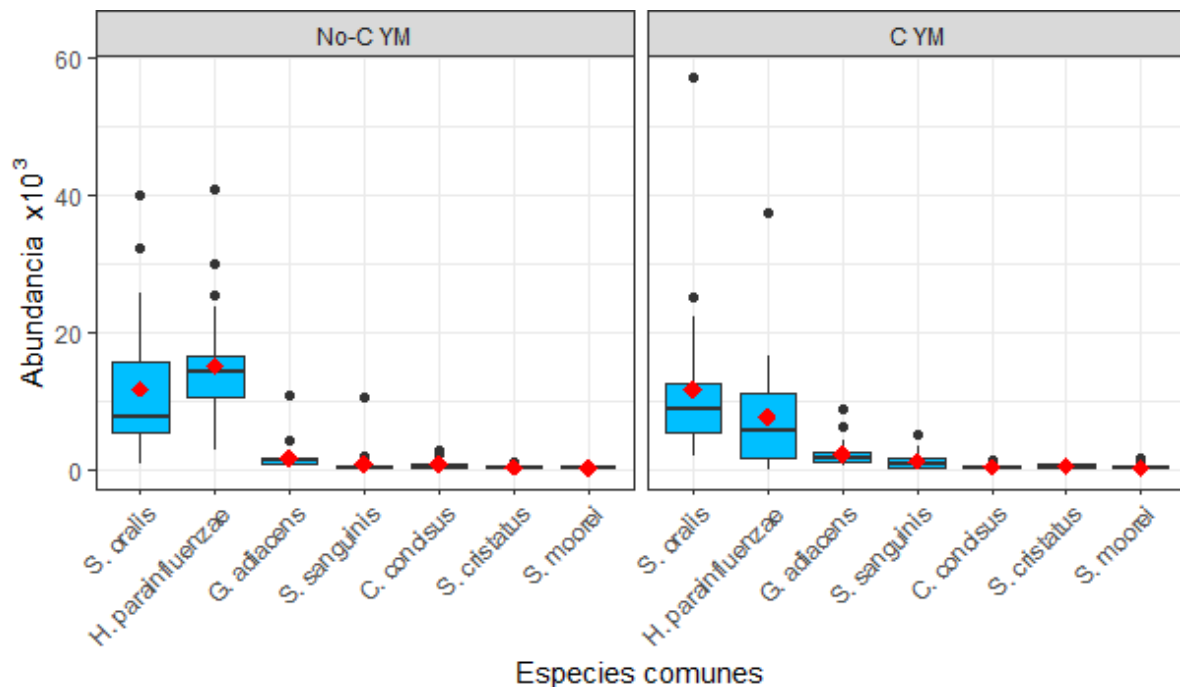


Figura 16. Abundancia de los principales especies bacterianas más abundantes encontradas en las muestras de los consumidores y no consumidores de yerba mate (Número de lecturas).

La Figura 17 muestra un mapa de calor de la abundancia relativa de las 20 especies bacterianas más abundantes en las muestras de saliva de consumidores (a) y no consumidores (b) de yerba mate. Cada celda del gráfico representa la abundancia relativa de una especie en una muestra específica, utilizando una escala de colores que va de azul (baja abundancia) a rojo (alta abundancia).

Los diagramas de agrupamiento a los lados y en la parte superior agrupan las muestras y especies basadas en su similitud, permitiendo identificar patrones comunes en la composición de la microbiota. En general, se observa que algunas especies presentan mayores abundancias en ciertos individuos, pero no se identifican diferencias marcadas entre los consumidores y no consumidores de

yerba mate, lo que sugiere que, a nivel de estas 20 especies más abundantes, la composición microbiana es bastante similar entre ambos grupos.

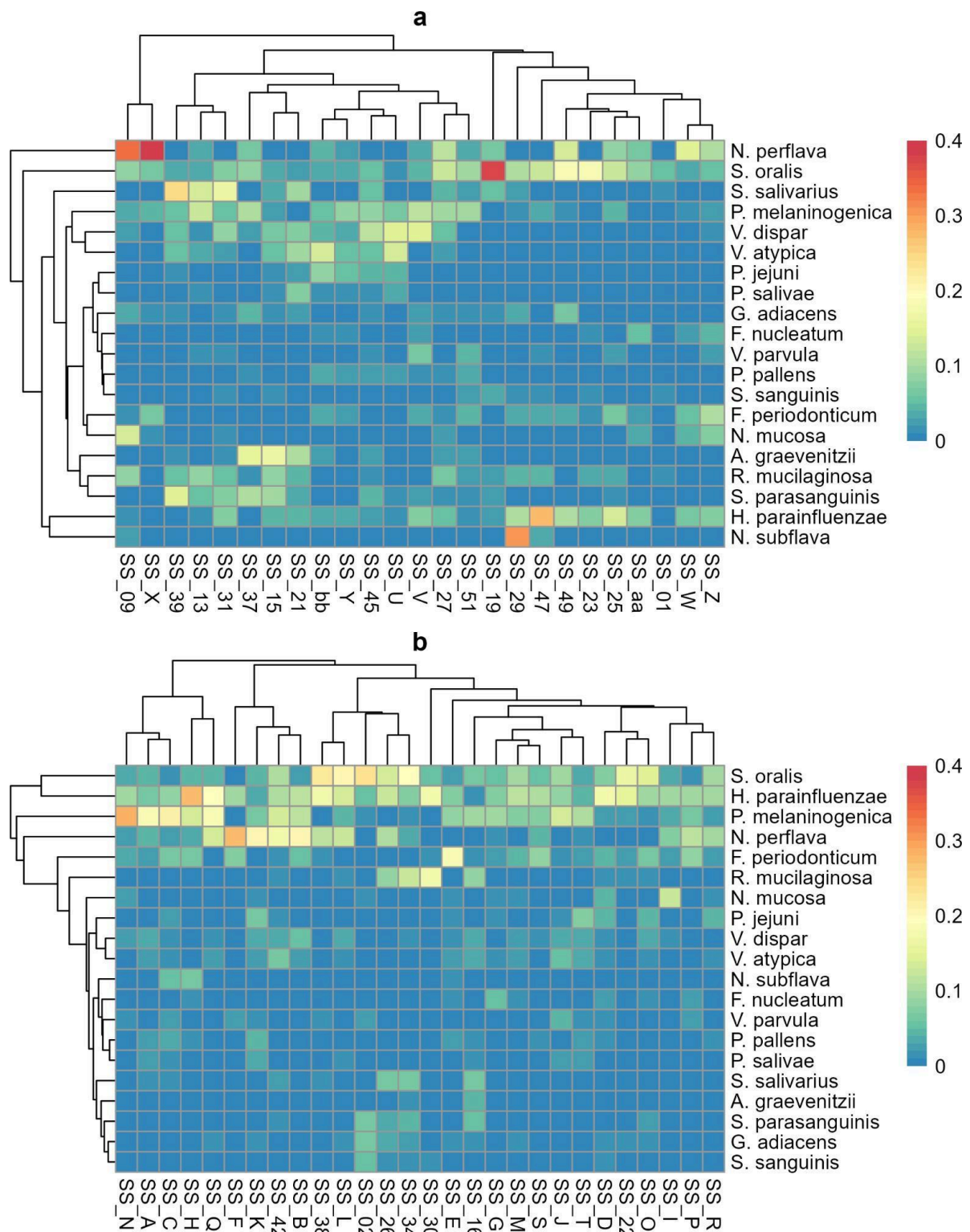


Figura 17. Abundancia relativa de las 20 especies más abundantes. a.- Consumidores de yerba mate, b.- No consumidores de yerba mate.

La Figura 18 muestra un análisis de redundancia (RDA) que examina la influencia del consumo de yerba mate y el sexo en la composición de la microbiota salival. Los dos primeros ejes de la gráfica (RDA1 y RDA2) explican un 74% y un 26% de la variabilidad total, respectivamente.

Los puntos representan a los individuos y están agrupados por colores: los consumidores de yerba mate (naranja) y los no consumidores (azul). Aunque las dos nubes de puntos se superponen en gran medida, el vector que representa el consumo de yerba mate (consumeYM) indica una ligera asociación con diferencias en la composición microbiana, respaldada por un valor de p significativo ($P = 0.004$), sugiriendo una leve pero significativa influencia del consumo de yerba mate en la estructura de la comunidad bacteriana.

Por otro lado, el vector que representa el sexo (sexo_M) no muestra una asociación significativa, como se refleja en el valor de p ($P = 0.893$), indicando que el sexo no parece influir de manera importante en la variabilidad de la microbiota en este análisis.

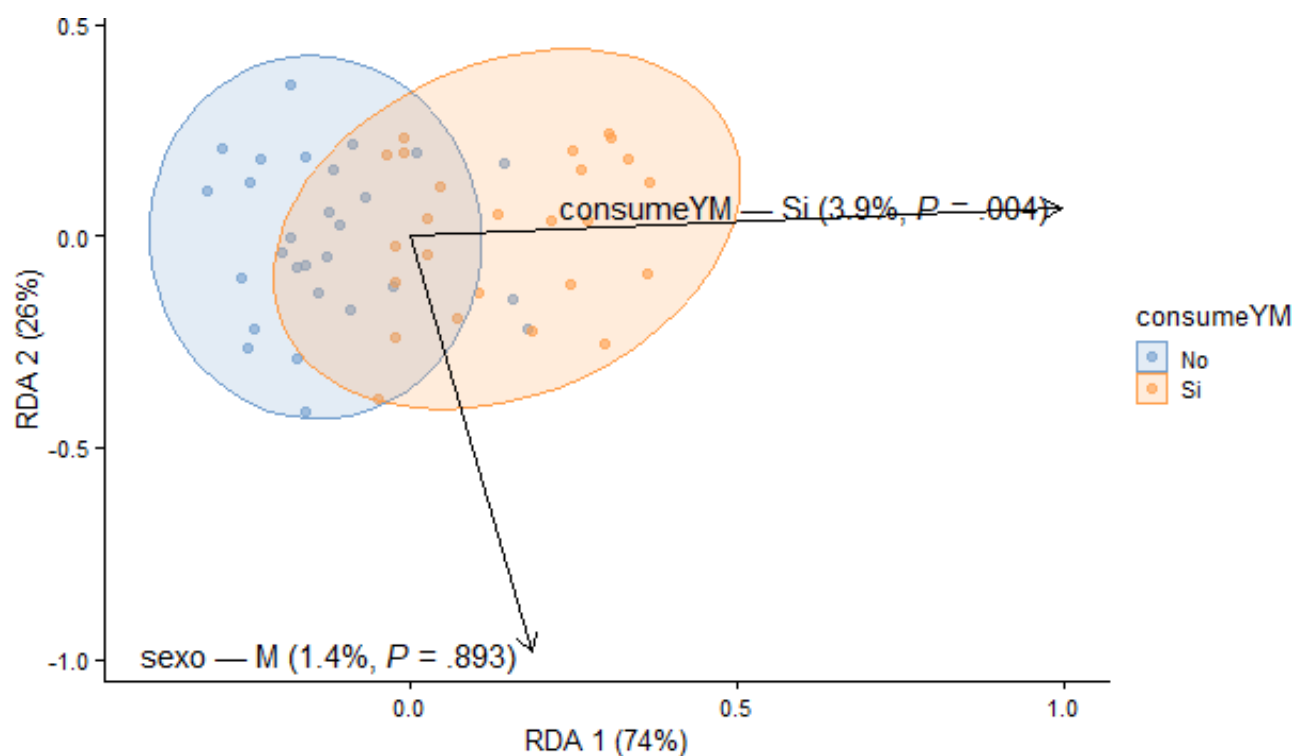


Figura 18. Análisis de redundancia (RDA) de la composición de la microbiota salival en función del consumo de yerba mate y el sexo.

En la Figura 19 en relación al análisis de escalado multidimensional no métrico (nMDS) utilizando la distancia de Bray-Curtis para comparar la composición de la microbiota salival entre consumidores de yerba mate (C YM, verde) y no consumidores (No-C YM, rojo). Cada punto en el gráfico representa una muestra individual, mientras que las elipses indican el rango de agrupamiento de cada grupo. El análisis NMDS mide la similitud en la composición bacteriana: cuanto más cercanos estén los puntos, más similares son las muestras en términos de su microbiota. El valor de "Stress" (0.197726) sugiere que la representación visual es adecuada para mostrar las diferencias entre los grupos, siendo un valor menor a 0.2 aceptable para este tipo de análisis.

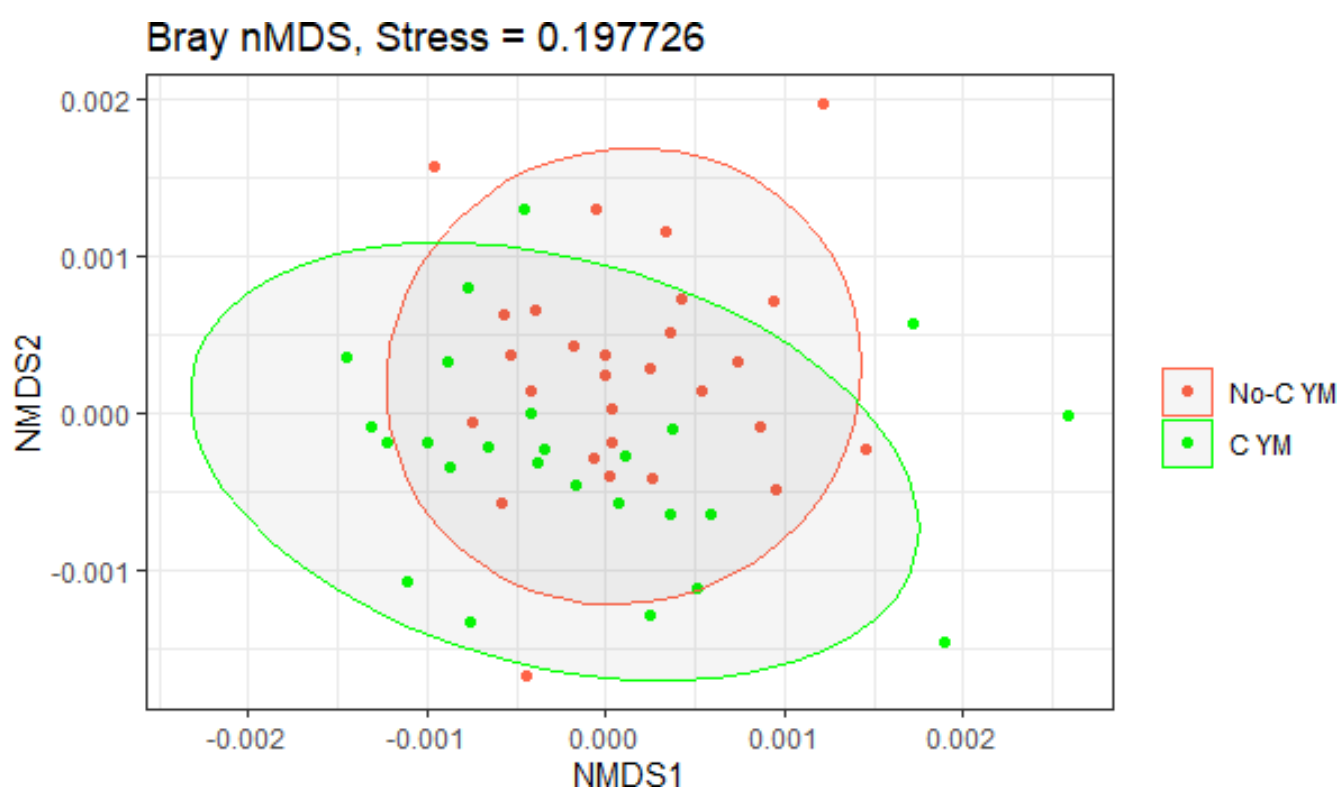


Figura 19. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) entre las muestras de consumidores y no consumidores de yerba mate. Se considera la prevalencia del 50% de las especies bacterianas.

La gráfica muestra las especies bacterianas con diferencias significativas en abundancia entre los dos grupos. En el eje X, se presenta el valor de beta, que indica la dirección y magnitud del cambio en la abundancia relativa de cada especie. Valores positivos de beta representan una mayor abundancia en los consumidores de yerba mate, mientras que valores negativos indican una mayor abundancia en los no consumidores. El tamaño de los puntos está relacionado con el valor absoluto de W, que representa la magnitud del cambio en la abundancia diferencial; puntos más grandes indican un efecto más robusto. Además, el color de los puntos se basa en el q-value, donde los tonos más oscuros y cercanos al azul indican valores de “q” más bajos y, por lo tanto, una mayor significancia estadística.

Prevotella oralis y *Neisseria bacilliformis* tienen beta positivo, lo que indica que son más comunes en los consumidores de yerba mate. En cambio, *Treponema refringens* y *Stenotrophomonas maltophilia*, que tienen beta negativo, son más comunes en los no consumidores.

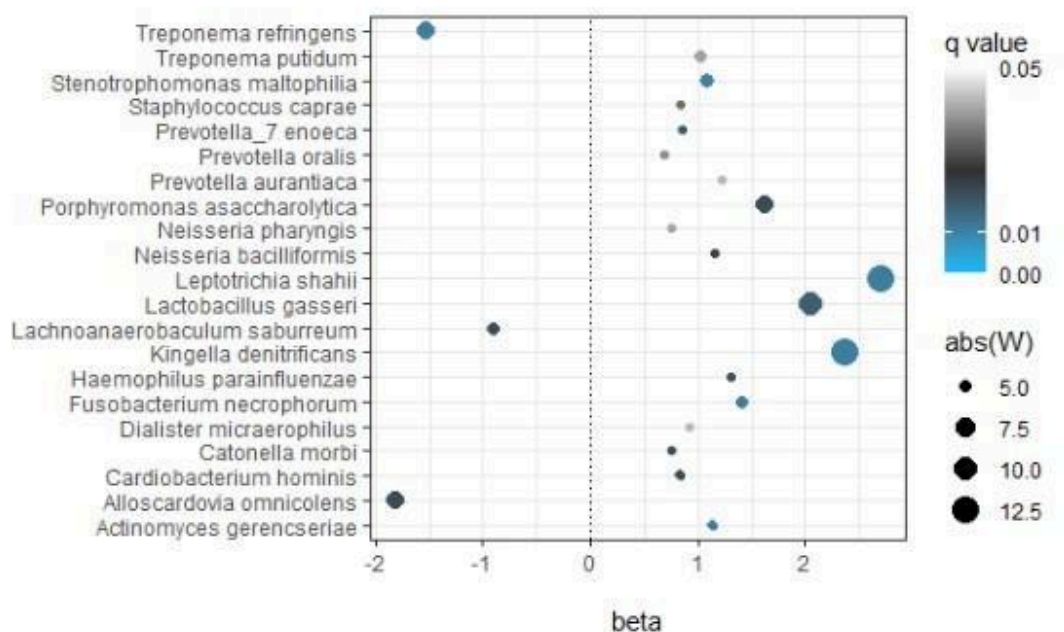


Figura 20. Abundancia diferencial de las especies.

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron cumplir con los objetivos específicos planteados. En primer lugar, se logró analizar los hábitos de consumo de yerba mate, alimentos, bebidas y prácticas de higiene bucal de la población en estudio (Objetivo Específico 1). Además, se caracterizó la microbiota salival en consumidores y no consumidores de yerba mate mediante el método de secuenciación 16S, evidenciando una composición y diversidad propias de cada grupo (Objetivo Específico 2). Finalmente, el análisis comparativo entre ambos grupos reveló diferencias significativas en la riqueza de especies y en la composición microbiana, lo que sugiere una influencia del consumo de yerba mate sobre la microbiota salival (Objetivos Específico 3 y 4). En conjunto, estos hallazgos aportan información relevante sobre el impacto de la yerba mate en la salud oral, logrando así cumplir con los objetivos de esta investigación.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una descripción integral de la composición de la microbiota salival en consumidores y no consumidores de yerba mate, utilizando la estrategia de secuenciación metabarcoding 16S. Se observó una alta abundancia relativa de especies del género *Streptococcus* en ambos grupos, destacando especies como *Streptococcus oralis*, *S. parasanguinis*, y *S. salivarius* como las más representativas. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que han identificado a *Streptococcus spp.* como uno de los géneros dominantes en el microbioma oral de diversas poblaciones (Ikeda et al., 2019). Además, *S. parasanguinis* y *salivarius* se encuentran mayoritariamente de forma específica en la saliva de individuos sanos (Belstrøm et al., 2021). Aunque no se observó una diferencia significativa en la abundancia del género *Streptococcus* entre consumidores y no consumidores de yerba mate, se detectaron subgrupos específicos de no consumidores con una mayor abundancia de *S. oralis*. Esto sugiere que, aunque la yerba mate no altera drásticamente la presencia de *Streptococcus*, podría tener un efecto modulador que favorece la diversidad general de la microbiota en los consumidores. Adicionalmente, el índice de Shannon no mostró diferencias significativas en la diversidad, pero el índice de Chao1 reveló una mayor riqueza de especies en los consumidores de yerba mate (496 frente a 431 en

no consumidores). Esto sugiere una comunidad microbiana más diversa y resiliente en los consumidores de yerba mate, apoyada también por una mayor cantidad de ASV y una menor pendiente en las curvas de acumulación, lo que coincide con estudios previos sobre infusiones ricas en polifenoles como el té verde. (Adami et al. 2018)

Estudios anteriores han demostrado que el consumo de té verde y otras infusiones puede influir en la microbiota oral al reducir la abundancia de especies patógenas como *S. mutans* (Adami et al., 2018 ; Hattarki et al., 2021). Aunque este efecto no fue observado de manera significativa en consumidores de yerba mate, los resultados sugieren que la yerba mate puede favorecer la proliferación de géneros beneficiosos como *Actinomyces* y *Prevotella*. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la yerba mate podría tener propiedades moduladoras similares a otras bebidas ricas en compuestos bioactivos.

Los datos adicionales obtenidos del cuestionario revelaron que los participantes, tanto consumidores como no consumidores, presentaban hábitos dietéticos similares, con un consumo moderado a alto de vegetales y productos lácteos, pero un consumo bajo de frutas. Este bajo consumo de frutas podría estar afectando la diversidad de la microbiota en general, ya que las dietas ricas en frutas y vegetales suelen estar asociadas con una mayor diversidad microbiana (Kim et al., 2021). También se observó que el consumo de café, que contiene polifenoles como la yerba mate, era común en ambos grupos, pero su impacto en la microbiota oral parece ser menos pronunciado que el de otras infusiones (Musarra-Pizzo et al., 2019). No se encontraron correlaciones significativas entre datos demográficos (como edad, género, índice de masa corporal) y la categoría de consumo de yerba mate, lo que sugiere que las diferencias observadas en la microbiota son principalmente atribuibles a los hábitos de consumo de yerba mate y no a otros factores confusos.

Es importante reconocer que existen limitaciones en el presente estudio. La variabilidad en la extracción de ADN y el tamaño de la muestra pueden haber afectado los resultados, limitando la capacidad de generalizar las conclusiones. Además, la metodología basada en 16S no permite cuantificar la carga bacteriana total, lo que limita las comparaciones absolutas entre grupos. También, el uso de

saliva como fuente de muestras refleja principalmente comunidades de la lengua y el paladar, lo que puede no ser completamente representativo del microbioma oral total (Segata et al., 2012).

Los hallazgos de este estudio subrayan la importancia de considerar el consumo de yerba mate al analizar la diversidad y composición de la microbiota salival. La mayor riqueza de especies observada en los consumidores de yerba mate sugiere una microbiota más equilibrada y resiliente, lo que podría tener implicaciones protectoras frente a condiciones relacionadas con disbiosis, como la caries dental y las enfermedades periodontales. Entender cómo la yerba mate y otros hábitos dietéticos influyen en la microbiota oral podría contribuir al desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas más personalizadas en la práctica clínica.

Es necesario realizar estudios a largo plazo para comprender mejor cómo el consumo regular de yerba mate afecta la microbiota oral a lo largo del tiempo y si sus efectos pueden ser potenciados por otros hábitos alimenticios saludables. Además, explorar diferentes formas de consumo (por ejemplo, yerba mate con o sin aditivos) podría proporcionar una comprensión más completa de su impacto en la salud bucal.

9. CONSIDERACIONES FINALES

Este estudio proporciona una visión general de la microbiota salival en consumidores y no consumidores de yerba mate, utilizando secuenciación 16S. Los resultados sugieren que el consumo regular de yerba mate podría asociarse con una mayor diversidad microbiana en la saliva, resaltando la importancia de considerar hábitos locales al evaluar la salud bucal. Se observó una alta abundancia de especies del género *Streptococcus* en ambos grupos, con algunas diferencias específicas. Esto refleja estudios previos que destacan el impacto de la dieta y bebidas ricas en compuestos bioactivos en la microbiota oral.

Aunque la yerba mate, por sus polifenoles, saponinas y xantinas, podría modular la microbiota de manera similar al té verde, las diferencias observadas entre los

grupos no siempre fueron significativas. Además, factores adicionales como el consumo de otras bebidas y la higiene bucal también influyen en la microbiota salival, subrayando la complejidad de estas interacciones.

El estudio presenta limitaciones, como el tamaño de la muestra y la dificultad para controlar todas las variables que afectan la microbiota, incluyendo la dieta y la genética individual. Por lo tanto, se requieren investigaciones adicionales con muestras más grandes y análisis longitudinales para comprender mejor la relación entre el consumo de yerba mate y la salud bucal, y para explorar los mecanismos específicos que subyacen a esta asociación.

10. REFERENCIAS

- Adami, G. R., Tangney, C. C., Tang, J. L., Zhou, Y., Ghaffari, S., Naqib, A., Sinha, S., Green, S. J., y Schwartz, J. L. (2018). Effects of green tea on miRNA and microbiome of oral epithelium. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22994-3>
- Andersen, T., y Fogh, J. (2001). Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.1046/j.1365-277x.2001.00290.x>
- Badanian, A., Bueno, L., Papone, V., Badanian, A., Bueno, L., y Papone, V. (2019). Análisis bacteriano comparativo de cuadros de Periodontitis Crónica y Agresiva en una

población muestra de Uruguay. *Odontoestomatología*, 21(33), Article 33.

<https://doi.org/10.22592/ode2019n33a2>

Balappanavar, A. (2020). Tea and Oral Health. En *Tea—Chemistry and Pharmacology*.

IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80998>

Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S. S., Lohan, S., Bhardwaj, V., Syan, N., y

Jyoti, S. (2013). Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research*

International, 53(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.032>

Bayo Calero, J. (Ed.). (2017). *Manual SEOM de prevención y diagnóstico precoz del cáncer*.

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).

Bellagambi, F. G., Lomonaco, T., Salvo, P., Vivaldi, F., Hangouët, M., Ghimenti, S., Biagini,

D., Di Francesco, F., Fuoco, R., y Errachid, A. (2020). Saliva sampling: Methods and

devices. An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115781.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115781>

Belstrøm, D., Constancias, F., Markvart, M., Sikora, M., Sørensen, C. E., y Givskov, M.

(2021). Transcriptional activity of predominant *Streptococcus* species at multiple oral

sites associate with periodontal status. *Frontiers in Cellular and Infection*

Microbiology, 11, 752664. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.752664>

Bortoluzzi, M. C., Guollo, A., y Capella, D. L. (2011). Pain levels after third molar surgical

removal: An evaluation of predictive variables. *The Journal of Contemporary Dental*

Practice, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1041>

Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., y Gugliucci, A. (2011). Recent

advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of*

Ethnopharmacology, 136(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>

Bradshaw, D. J., y Marsh, P. D. (1998). Analysis of pH–Driven Disruption of Oral Microbial

Communities in vitro. *Caries Research*, 32(6), Article 6.

<https://doi.org/10.1159/000016487>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P.

(2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.

Nature Methods, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Chen, Y.-K., Lee, C.-H., Wu, I.-C., Liu, J.-S., Wu, D.-C., Lee, J.-M., Goan, Y.-G., Chou, S.-H., Huang, C.-T., Lee, C.-Y., Hung, H.-C., Yang, J.-F., y Wu, M.-T. (2009). Food intake and the occurrence of squamous cell carcinoma in different sections of the esophagus in Taiwanese men. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 25(7–8), Article 7–8. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.02.002>
- Chinsembu, K. C. (2016). Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Tropica*, 154, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.019>
- Cruz Quintana, S. M., Díaz Sjöstrom, P., Arias Socarrás, D., y Mazón Baldeón, G. M. (2017). Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), Article 1.
- Deo, P. N., y Deshmukh, R. (2019a). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 23(1), Article 1. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Deo, P. N., y Deshmukh, R. (2019b). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 23(1), Article 1. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Ernst, F., Shetty, S., Borman, T., y Lahti, L. (2024). *Mia: Microbiome analysis. R package* (Versión 1.11.9) [Software]. [object Object]. <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.MIA>
- Filip, R., Sebastian, T., Ferraro, G., y Anesini, C. (2007). Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.014>
- Funosas, E. R., Martínez, A. B., Pignolo, M., Maestri, L., Aromando, R. F., Scozzarro, S. M., Escovich, L., y Hermida, P. S. (2005). Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica. *Avances en Odontoestomatología*, 21(3), Article 3.

- García Padilla, K. R. (2015). *Efecto antibacteriano de una infusión de Camellia sinensis (té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva*. Universidad Nacional de Trujillo. Escuela de Postgrado. Sección de Postgrado en Ciencias Médicas.
- Gómez-García, A., López-Vidal, Y., y Aguirre-García, M. (2022). Oral Microbiome: Variability Between Regions and Populations. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 65, 8–19.
<https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2022.65.5.02>
- Goodson, J. M., Hartman, M.-L., Shi, P., Hasturk, H., Yaskell, T., Vargas, J., Song, X., Cugini, M., Barake, R., Alsmadi, O., Al-Mutawa, S., Ariga, J., Soparkar, P., Behbehani, J., y Behbehani, K. (2017). The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PLOS ONE*, 12(3), Article 3.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22.
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112007000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gupta, V. K., Paul, S., y Dutta, C. (2017). Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>
- Hattarki, S., Bogar, C., y Bhat, K. (2021). Green tea catechins showed antibacterial activity on streptococcus mutans –An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 32(2), Article 2. https://doi.org/10.4103/ijdr.ijdr_512_21
- Head, D. A., Marsh, P. D., y Devine, D. A. (2014). Non-Lethal Control of the Cariogenic Potential of an Agent-Based Model for Dental Plaque. *PLoS ONE*, 9(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105012>
- Heck, C. I., y De Mejía, E. G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological

Considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), Article 9.

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>

Huartamendia, R., Nappa, A., y Queirolo, R. (2012). Problemas de salud bucal relacionados al uso de medicamentos por vía inhalatoria en trastornos respiratorios.

Odontoestomatología, 14(20), Article 20.

Ikeda, E., Shiba, T., Ikeda, Y., Suda, W., Nakasato, A., Takeuchi, Y., Azuma, M., Hattori, M., y Izumi, Y. (2019). Deep sequencing reveals specific bacterial signatures in the subgingival microbiota of healthy subjects. *Clinical Oral Investigations*, 23(3),

Article

3. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02805-3>

Lanzetti, M., Bezerra, F. S., Romana-Souza, B., Brando-Lima, A. C., Koatz, V. L. G., Porto, L. C., y Valenca, S. S. (2008). Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 24(4),

Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.01.002>

Larrucea, C., Henríquez, E., Inostroza, M., Campos, L., Peña, C., Larrucea, C., Arenas, M., y Larrucea, K. (2013). Efecto Inmediato de Infusiones de Consumo Habitual en las Propiedades Salivales. *International journal of odontostomatology*, 7(3), Article

3. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2013000300002>

Liébana Ureña, J. (2002). *Microbiología Oral* (2a. Ed). McGraw-Hill Interamericana S.A.

Liu, L., Hou, L., Gu, S., Zuo, X., Meng, D., Luo, M., Zhang, X., Huang, S., y Zhao, X. (2015).

Molecular mechanism of epigallocatechin-3-gallate in human esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 33(1), Article 1.

<https://doi.org/10.3892/or.2014.3555>

Loria, D., Barrios, E., y Zanetti, R. (2009). Cancer and yerba mate consumption: A review of possible associations. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 25(6), Article 6.

<https://doi.org/10.1590/S1020-49892009000600010>

Lutomski, P., Goździewska, M., y Florek-Łuszczki, M. (2020). Health properties of Yerba Mate. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(2), Article 2.

<https://doi.org/10.26444/aaem/119994>

Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., y Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral

- microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- McLaren, M. R., y Callahan, B. J. (2021). *Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2* [Dataset]. Zenodo.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.4587955>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Musarra-Pizzo, M., Ginestra, G., Smeriglio, A., Pennisi, R., Sciortino, M. T., y Mandalari, G. (2019). The Antimicrobial and Antiviral Activity of Polyphenols from Almond (*Prunus dulcis* L.) Skin. *Nutrients*, 11(10), Article 10.
<https://doi.org/10.3390/nu11102355>
- Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica*. Ed. Médica Panamericana.
- Ooshima, T. (2005). Anti-caries activity of tea polyphenols. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 210(4), Article 4.
- Pagliosa, C. M., Vieira, M. A., Podestá, R., Maraschin, M., Zeni, A. L. B., Amante, E. R., y Amboni, R. D. D. M. C. (2010). Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *Food Chemistry*, 122(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.040>
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., y Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x>
- R Core Team. (2024). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rausch, P., Rühlemann, M., Hermes, B. M., Doms, S., Dagan, T., Dierking, K., Domin, H., Fraune, S., Von Frieling, J., Hentschel, U., Heinsen, F.-A., Höppner, M., Jahn, M. T., Jaspers, C., Kissoyan, K. A. B., Langfeldt, D., Rehman, A., Reusch, T. B. H., Roeder,

T., ... Baines, J. F. (2019). Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms.

Microbiome, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0743-1>

- Ríos Duarte, F. (2019). *Efectos de la Ilex paraguariensis (yerba mate) en el electroencefalograma y en procesos cognitivos asociados a la percepción, atención y memoria* [Universidad de la República. Facultad de Medicina. Escuela Universitaria de Tecnología Médica]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/21011>
- Santos, D., Vargas, B. K., Frota, E. G., Biduski, B., Lopes, S. T., Gutkoski, J. P., Dos Santos, L. F., Ritterbusch, G. A., Barcelos, R. P., Somacal, S., Emanuelli, T., y Bertolin, T. E. (2023). Gut Microbiota Modulation by Bioactive Compounds from *Ilex paraguariensis*: An In Vivo Study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 78(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01117-y>
- Segata, N., Haake, S., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., y Izard, J. (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r42>
- Serrano-Coll, H. A., Sánchez-Jiménez, M., y Cardona-Castro, N. (2015). Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *CES Odontología*, 28(2), 112–118.
- Sierra, M. A., Li, Q., Pushalkar, S., Paul, B., Sandoval, T. A., Kamer, A. R., Corby, P., Guo, Y., Ruff, R. R., Alekseyenko, A. V., Li, X., y Saxena, D. (2020). The Influences of Bioinformatics Tools and Reference Databases in Analyzing the Human Oral Microbial Community. *Genes*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/genes11080878>
- Topcuoglu, N., y Kulekci, G. (2015). 16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis. *Anaerobe*, 35, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.01.011>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., y Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas.

Ciencias marinas, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Velden, U., Winkelhoff, A. J., Abbas, F., y Graaff, J. (1986). The habitat of periodontopathic micro-organisms. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1986.tb01467.x>

Wang, Z., Tang, L., Sun, G., Tang, Y., Xie, Y., Wang, S., Hu, X., Gao, W., Cox, S. B., y Wang, J.-S. (2006). Etiological study of esophageal squamous cell carcinoma in an endemic region: A population-based case control study in Huaian, China. *BMC Cancer*, 6, 287. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-287>

Zymo Research. (2023). *ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit*. <https://www.zymoresearch.com/>

11. ANEXOS

11.1. Consentimiento informado

Nombres y Apellidos del participante	
Número de identificación del participante	
Fecha de nacimiento del participante	

Declaración del investigador:

Confirmando que he explicado paso a paso la investigación en que el participante será participante. Igualmente, he explicado al participante el propósito de dicha investigación y la garantía de mantener el anonimato los datos del participante.

Nombres y Apellidos del investigador: _____

Firma: _____

Declaración del participante en el estudio

Declaro que he sido informado e invitado a participar en una investigación titulada **“Cambios en la microbiota salival y sus efectos en participantes consumidores de yerba mate en estudiantes de Odontología – Udelar, Montevideo 2023”**. Como participante en el estudio entiendo que este busca analizar la microbiota salival en individuos consumidores y no consumidores de yerba mate en Uruguay y sé que mi participación se llevará a cabo en el servicio de la facultad de odontología, en el servicio de Registro - Udelar en el horario de las 9 a las 12 hs y consistirá en que tomen una muestra de mi saliva. Me han explicado que la información registrada será confidencial, y que los nombres de los participantes serán asociados a un número de serie, esto significa que las respuestas no podrán ser conocidas por otras personas ni tampoco ser identificadas en la fase de publicación de resultados. Estoy en conocimiento que los datos no me serán entregados y que no habrá retribución por la participación en este estudio, sí que esta información podrá beneficiar de manera indirecta y por lo tanto tiene un beneficio para la sociedad, dada la investigación que se está llevando a cabo. Asimismo, ***sé que puedo negar la participación o retirarme en cualquier etapa de la investigación, sin expresión de causa ni consecuencias negativas para mí.*** En cualquier caso, puedo contar con más información comunicándome con la encargada de la investigación, la Dra. Bárbara García Fontana, celular: 091282028 y dirección de correo electrónico bgarciafontana@gmail.com

Firma del participante: _____

Revocar el consentimiento:_____

11.2. Cuestionario para el participante

Edad:

Sexo:

Peso:

Estatura:

- 1) ¿Usted consume un termo (1L) de mate diario? _____
- 2) ¿Lo hace durante el día o en un momento del día?
Durante el día () En determinado momento del día ()
- 3) ¿Cuál es la marca que sueles consumir? _____
- 4) ¿Qué tipo de yerba consumes?
 - Orgánica
 - Saborizada
 - Con palo
 - Sin palo
 - Otras
- 5) ¿Cómo prefieres la temperatura para beber el mate?
 - Muy caliente
 - Caliente
 - Tibia
- 6) ¿Agregas al mate alguna planta medicinal (como tilo, cola de caballo, etc...)? Cuál? _____
- 7) Marque en una escala del 0 - 5 cuánto suele consumir al día, donde 0 es que no consume y 5 es mucho.
 - Agua _____
 - Comida frita _____
 - Frutas _____
 - Vegetales y verduras _____
 - Té verde _____
 - Té negro _____
 - Café _____
 - Probióticos _____
 - Lácteos (leche, queso, yogurt) _____
 - Dulces (caramelos, chicles, chupetines) _____
 - Bizcochos, galletas, alfajores. _____
- 8) ¿Con qué frecuencia Ud. cepilla sus dientes al día? 0
1
2
3
Más de tres

Enfermedades gastrointestinales _____ ¿Cuál?

11.3. Aval del Instituto de Bioinformática

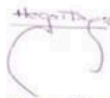
Montevideo, 20 de junio, 2022

A quien corresponda,

Por este medio dejo constancia de mi conocimiento como Responsable de la Unidad de Bioinformática del proyecto de la estudiante de Maestría en Odonotología Bárbara García, titulado “Cambios en la microbiota salival y sus efectos en pacientes tomadores de yerba mate en Montevideo, Uruguay”.

Por otra parte, dejo constancia también de que formaré parte del equipo de investigación, en especial en lo concerniente al análisis estadístico de los datos que se generen en este contexto.

Atentamente,



Hugo Naya
Responsable de la Unidad de Bioinformática
Institut Pasteur de Montevideo

11.4. Aprobación del comité de bioética.



Montevideo, 19 de julio de 2023.-

Doctora,
Bárbara García

Se comunica a usted la resolución adoptada por el Comité de Ética de fecha 13/07/23;

RESOLUCIÓN No. 1.

Exp. 091900-000014-22.- DE ACUERDO con las correcciones elevadas, APROBAR el Proyecto titulado " Cambios en la microbiota salival y sus efectos en pacientes tomadores de yerba mate en la República Oriental del Uruguay ", presentado por la Dra. Bárbara García. (4 en 4).

Sin otro particular, saluda atentamente;

Dra. Alicia Picapedra
Coordinadora del Comité de Ética

11.5. Diagrama del protocolo del Kit de extracción de ADN:



11.6. Reads resultate por muestra

Muestra	Lectura inicial	Lectura Filtrada	Lectura Depurada Forward	Lectura Depurada Reverse	Lecturas Combinadas	Lecturas No Quiméricas
SS_01	204701	175530	175317	175247	174507	171398
SS_02	202755	184603	184136	183992	182243	173576
SS_09	207633	177692	174849	175521	163225	107700
SS_13	212844	201844	198559	198379	184280	111898
SS_15	202701	192248	190028	190407	181526	121707
SS_16	204237	193600	191816	191822	184767	133966
SS_19	206299	176011	175374	175140	173015	151569
SS_21	203767	174265	172629	172861	165453	109470
SS_22	204813	173710	172471	172447	167611	135555
SS_23	206448	176973	174542	174843	165641	121088
SS_25	208627	183092	180116	180397	168269	122642
SS_26	203186	177069	175606	175660	169419	120250
SS_27	203795	175833	172954	173228	160011	101859
SS_29	204765	174951	173190	173040	165354	134043
SS_30	204433	177189	175520	175786	169770	118634
SS_31	203022	182223	180141	180154	170721	111710
SS_34	205149	177054	174582	174905	164918	107112
SS_37	203332	193410	191896	191812	185576	139664
SS_38	203126	172509	171355	171602	167425	141679
SS_39	205941	194748	192878	192957	185463	123683
SS_42	206212	182744	180534	180729	171527	120721
SS_45	198602	177117	175712	175772	170148	133935
SS_47	207175	184956	183167	183220	175528	138641
SS_49	204276	174559	173460	173517	168767	136952
SS_51	209333	177907	175135	175814	165390	122385
SS_A	205719	171895	170132	170072	161839	133118
SS_aa	206443	188035	186091	186020	178197	143935
SS_B	203617	172450	170996	171040	163937	141714
SS_bb	205569	187826	185893	186188	177556	146742
SS_C	206312	172171	170020	170217	160802	128978
SS_D	218556	184483	182045	182388	170404	139331
SS_E	202582	172955	171492	171543	164840	143851
SS_F	212009	187356	185763	185916	180089	154659

SS_G	218670	198698	195662	195852	182457	142270
SS_H	203862	186250	184442	184546	176082	148264
SS_I	205598	189893	188302	188089	180960	153041
SS_J	202716	185591	184322	184151	177152	149558
SS_K	203456	185365	183336	183253	172497	123449
SS_L	143982	131999	131392	131214	129037	122640
SS_M	185000	170493	168957	168986	162485	139116
SS_N	202451	184906	183464	183676	177875	150472
SS_O	209387	189870	187964	187912	178861	151407
SS_P	206599	187381	186164	186043	180287	163034
SS_Q	203834	185971	184730	184896	180124	154159
SS_R	213953	194814	193072	193315	186181	159100
SS_S	206347	189006	186918	187102	179317	144071
SS_T	206209	188072	185529	185764	174821	133360
SS_U	203755	185738	184374	184307	177858	134127
SS_V	203911	185786	184308	184144	177826	152574
SS_W	203367	185443	183445	183420	175505	151422
SS_X	217539	198945	197855	197855	193242	174179
SS_Y	214965	196794	194858	194886	186226	153029
SS_Z	206549	187243	185076	185146	175628	147497

11.7. Script en DADA2 para detección de ASVs

```
library(dada2)
) path<-"."

# Forward and reverse fastq filenames have format: SAMPLENAME_1.fastq.gz and
SAMPLENAME_2.fastq.gz

fnFs <- sort(list.files(path, pattern="_1.fastq.gz", full.names = TRUE))
fnRs <- sort(list.files(path, pattern="_2.fastq.gz", full.names = TRUE))

# Extract sample names, assuming filenames have format: SAMPLENAME_XXX.fastq.gz
sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_1.fastq.gz"), `[`, 1)

# Plot qualities to check length parameter filter
pdf("qualities.pdf")
  plotQualityProfile(fnFs[1:2])
  plotQualityProfile(fnRs[1:2])
dev.off()

# Place filtered files in filtered/ subdirectory
filtFs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_F_filt.fastq.gz"))
filtRs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names,
"_R_filt.fastq.gz")) names(filtFs) <- sample.names
names(filtRs) <- sample.names

out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs,
  maxN=0, maxEE=c(2,2), truncQ=2, rm.phix=TRUE,
  compress=TRUE, multithread=TRUE) # On Windows set multithread=FALSE

errF <- learnErrors(filtFs, multithread=TRUE)
errR <- learnErrors(filtRs, multithread=TRUE)

pdf("plotErrors.pdf")
  plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)
  plotErrors(errR,
    nominalQ=TRUE)
dev.off()

dadaFs <- dada(filtFs, err=errF, multithread=TRUE)
dadaRs <- dada(filtRs, err=errR, multithread=TRUE)

mergers <- mergePairs(dadaFs, filtFs, dadaRs, filtRs, verbose=TRUE)

seqtab <- makeSequenceTable(mergers)

# Inspect distribution of sequence lengths
table(nchar(getSequences(seqtab)))

seqtab2 <- seqtab[,nchar(colnames(seqtab)) %in% seq(330,443)]

seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab2, method="consensus", multithread=TRUE,
verbose=TRUE)
```

11.8. Clasificación taxonómica de las bacterias presentes en la saliva de consumidores y no consumidores de yerba mate.

Reads únicos: 579

Especies únicas: 309

11.9. Pruebas de normalidad.

Datos	Grupo	Shapiro	Decisión
Abundancia/muestra	No-C YM	0.985	No rechazar H0
Abundancia/muestra	C YM	0.564	No rechazar H0
ASVs/muestra	No-C YM	0.119	No rechazar H0
ASVs/muestra	C YM	0.696	No rechazar H0
Especies/muestra	No-C YM	0.414	No rechazar H0
Especies/muestra	C YM	0.00356	*Rechazar H0
Diversidad/muestra	No-C YM	0.438	No rechazar H0
Diversidad/muestra	C YM	0.338	No rechazar H0
Chao1/muestra	No-C YM	0.109	No rechazar H0
Chao1/muestra	C YM	0.689	No rechazar H0

11.10. Pruebas de homogeneidad.

Datos	F	Levene	Decisión
Abundancia/muestra	1.6604	0.2034	No rechazar H0
ASVs/muestra	3.142	0.08227	No rechazar H0
Especies/muestra	1.914	0.1725	No rechazar H0
Diversidad/muestra	2.1253	0.151	No rechazar H0
Chao1/muestra	3.188	0.0801	No rechazar H0