

Investigación

Streptococcus dentisani y su rol probiótico en el desarrollo de caries dentales

Streptococcus dentisani and its probiotic role in the development of dental caries

AUTORES

DR. RODOLFO MATÍAS ORTIZ FLORES

Licenciado en Biología Molecular. Doctor en Ciencias Biológicas. Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo-CONICET. JTP Simple. Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Cuyo.

E-mail: rortiz@fodonto.uncu.edu.ar

OD. MARÍA CECILIA PORTA

Odontóloga. Profesora Titular Efectiva. Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología. Universidad

Nacional de Cuyo. *E-mail: ceciporta@yahoo.com*

DRA. CORINA VERÓNICA SASSO

(AUTOR CORRESPONDIENTE)

Licenciada en Biología Molecular. Doctora en Ciencias Biológicas. Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Universidad Nacional de Cuyo-CONICET. Auxiliar de Primera Simple. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Cuyo.

Email: csasso@fodonto.uncu.edu.ar

RESUMEN

La manifestación de la caries dental está mediada por mecanismos complejos que son iniciados por factores genéticos, conductuales, ambientales y microbianos. En el caso de los factores microbianos, la presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones de caries. Al determinar la presencia de ciertas especies bacterianas en cada etapa de avance de la lesión, se ha evidenciado que algunas especies bacterianas predominan sólo en las etapas iniciales, y otras exclusivamente en las etapas avanzadas de la lesión. Cada lesión de caries representa un ecosistema único, donde las especies microbianas presentes conforman una biopelícula ("biofilm"), y en el que ocurren interrelaciones de sinergismo y antagonismo que determinan la presencia y el crecimiento de microorganismos oportunistas más virulentos y la inhibición de microorganismos residentes poco virulentos.

Con respecto a los microorganismos de cavidad oral con caries dental, se ha establecido la importancia principal de *Streptococcus mutans* y microorganismos relacionados (*S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downii* y *S. macacae*).

ABSTRACT

The manifestation of dental caries is mediated by complex mechanisms that are initiated by genetic, behavioral, environmental and microbial factors. In the case of microbial factors, the presence of bacteria is essential for the onset and progression of caries lesions. When determining the presence of certain bacterial species at each stage of the lesion, it has been shown that some bacterial species predominate only in the initial stages, and others exclusively in the advanced stages of the lesion. Each caries lesion represents a unique ecosystem, where the microbial species present make up a "biofilm", and in which interrelations of synergism and antagonism occur that determine the presence and growth of more virulent opportunistic microorganisms and the inhibition of resident microorganisms less virulent.

*Regarding the oral cavity microorganisms with dental caries, the main importance of *Streptococcus mutans* and related microorganisms has been established (*S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downii* and *S. macacae*). However, species of the genus *Streptococcus* may constitute more than 50% of the oral microbiota in healthy individuals. In*

Streptococcus dentisani y su rol probiótico en el desarrollo de caries dentales

Dr. Rodolfo Matias Ortiz Flores; Od. María Cecilia Porta; Dra. Corina Verónica Sasso

No obstante, las especies del género *Streptococcus* pueden constituir más del 50% de la microbiota oral en los individuos sanos. De esta manera, pueden tener efectos positivos en la salud humana, y algunos de ellos, pertenecientes al grupo Mitis, han comenzado a ser utilizados como probióticos en los trastornos del sistema digestivo. La biopelícula dental consiste en una mezcla compleja de microorganismos que se presentan principalmente como microcolonias. La microbiota oral residente tiene una capacidad intrínseca para proteger al hospedador contra microbios invasores y para contribuir al desarrollo de los mecanismos de defensa del hospedador, pero también, ésta puede atraer cocos grampositivos como *S. mutans* y *S. sanguinis* que representan los organismos pioneros en el desarrollo de caries. Recientemente, *Streptococcus dentisani*, ha sido aislada de superficies dentales humanas libres de caries. Esta novedosa bacteria podría estar implicada en la modulación y prevención de caries dental, inhibiendo a *S. mutans*, mediante la producción de inhibidores de naturaleza peptídica, tales como péptidos similares a bacteriocinas, que lo convierte en un candidato ideal como agente probiótico ante la caries dental. Sin embargo, es escasa la bibliografía disponible sobre los mecanismos de interacción de esta bacteria con el hospedador, y la protección de este frente a diversos patógenos de la cavidad oral. Por lo que este trabajo tiene como objetivo fue estudiar las propiedades antibacterianas de esta novedosa bacteria, específicamente sobre *S. mutans*.

Palabras clave: *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus mutans*, probiótico, caries dental.

this way, they can have positive effects on human health, and some of them, belonging to the Mitis group, have begun to be used as probiotics in digestive system disorders. The dental biofilm consists of a complex mixture of microorganisms that occur primarily as microcolonies. The resident oral microbiota has an intrinsic ability to protect the host against invading microbes and to contribute to the development of host defense mechanisms, but also, it can attract gram-positive cocci such as S. mutans and S. sanguinis that represent the pioneer organisms in caries development. Recently, Streptococcus dentisani, has been isolated from caries-free human dental surfaces. This novel bacterium could be involved in the modulation and prevention of dental caries, inhibiting S. mutans, through the production of inhibitors of a peptide nature, such as peptides similar to bacteriocins, which makes it an ideal candidate as a probiotic agent against caries dental. However, the available literature on the mechanisms of interaction of this bacterium with the host is scarce, and its protection against various pathogens of the oral cavity. Therefore, this work aims to study the antibacterial properties of this novel bacteria, specifically on S. mutans.

Key words: *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus mutans*, probiotic, dental caries.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucodentales son las enfermedades no transmisibles más comunes, y afectan a las personas durante toda su vida, causando dolor, molestias, desfiguración e incluso la muerte. Según estimaciones publicadas en el estudio sobre la carga mundial de morbilidad 2016, las enfermedades bucodentales afectan a la mitad de la población mundial (3580 millones de personas), y la caries dental en dientes permanentes es el trastorno más prevalente (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>). Estas enfermedades bucodentales,

además de consecuencias físicas, tienen implicancias económicas y psicosociales, e involucran microorganismos que asientan en comunidades de especies mixtas. En la actualidad se considera que su etiología es claramente multifactorial y ecológicamente determinada (1,2) y los microorganismos implicados forman parte de la microbiota normal en individuos clínicamente sanos (3). Con respecto a los microorganismos de cavidad oral con caries, se ha establecido la importancia principal de *Streptococcus mutans* y microorganismos relacionados (*S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downii* y *S. macacae*) (4), así

como lactobacilos acidogénicos y acidotolerantes que, al igual que el *S. mutans*, convierten los carbohidratos fermentables en ácido láctico, generando así la desmineralización de los dientes (5). Entre los factores de patogenicidad de *S. mutans*, se destacan principalmente dos aspectos: el poder acidógeno-acidófilo-acidúrico (6-8), y la producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos (9). Los estreptococos orales humanos son "comensales" que a menudo habitan los tractos gastrointestinal y genitourinario, así como la mucosa oral y las superficies de los dientes. En los individuos sanos, los estreptococos

Streptococcus dentisani y su rol probiótico en el desarrollo de caries dentales

Dr. Rodolfo Matias Ortiz Flores; Od. Maria Cecilia Porta; Dra. Corina Verónica Sasso

tococos pueden constituir más del 50% de la microbiota oral (10) representando un potencial patogénico bajo. Sin embargo, los estreptococos orales pueden pasar al torrente sanguíneo y tienen el potencial de causar endocarditis infecciosa o sepsis post-antineoplásica en pacientes neutropénicos con enfermedad hematológica. Se ha demostrado que las bacterias de este grupo están implicadas en la exacerbación de la infección por influenza (11,12). Durante la identificación de bacterias en bocas libres de caries dentales, se encontró que *S. mitis* fue la especie predominante (13-15). Interesantemente, las especies del género *Streptococcus* también tienen efectos positivos en la salud humana, y algunos de los pertenecientes al grupo Mitis, han comenzado a ser utilizados como probióticos en los trastornos del sistema digestivo (16). Recientemente, una novedosa bacteria se aisló de superficies dentales humanas libres de caries. Se trata de *S. dentisani*, un coco no esporulado, no motil, Gram-positivo y catalasa-negativo, que crece en cadenas cortas, formando colonias de aproximadamente 1,5 mm de diámetro, anaerobio facultativo y α -hemolítico en placas de agar de sangre (17). La filogenética de *S. dentisani* se estudió en profundidad mediante la reconstrucción de los árboles sobre la base de dos marcadores moleculares relevantes: el gen de la enzima superóxido dismutasa y el gen ARNr 16S. Los resultados globales indican que *S. dentisani* representa una especie novedosa del género *Streptococcus* muy estrechamente relacionada con *S. oralis* y perteneciente al grupo Mitis. Este microorganismo podría estar implicado en la modulación y prevención de caries dental inhibiendo a *S. mutans*, mediante la producción de inhibidores de naturaleza peptídica, tales como péptidos similares a bacteriocinas (18). Sin embargo, es escasa la bibliografía disponible sobre los mecanismos de interacción de esta bacteria con el hospedador, y la protección de este frente a diversos patógenos de la cavidad oral. En base a los antecedentes mencionados

Figura 1 A

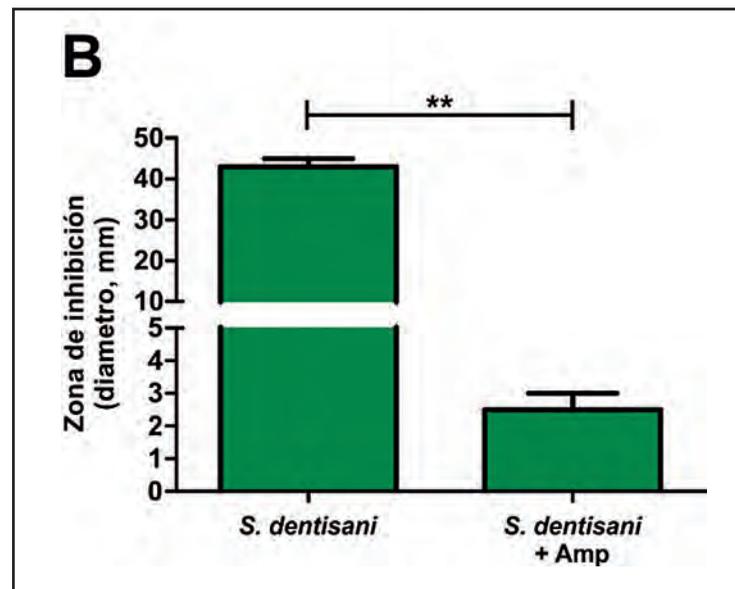
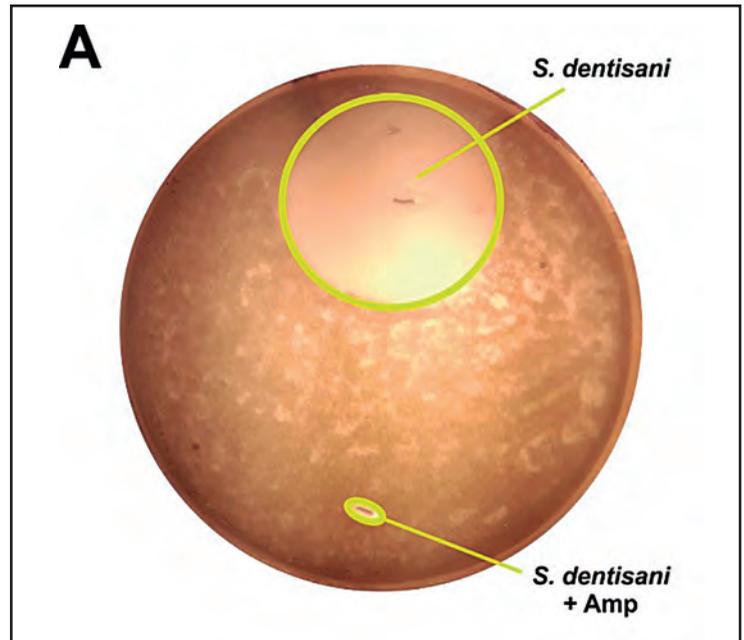


Figura 1 B

Figura 1: Inhibición de *S. mutans* por la presencia de *S. dentisani*. Identificación de la inhibición de crecimiento de *S. mutans* por presencia de halo de inhibición de crecimiento. En Agar ICC se cocultiva *S. mutans* y *S. dentisani*, este último en ausencia (círculo amarillo) o presencia (óvalo amarillo) de Ampicilina. (A) Halo de inhibición de crecimiento de *S. mutans* en presencia de *S. dentisani*. (B) Cuantificación del diámetro de los halos de inhibición. ** $p < 0,05$.

Streptococcus dentisani y su rol probiótico en el desarrollo de caries dentales

Dr. Rodolfo Matias Ortiz Flores; Od. Maria Cecilia Porta; Dra. Corina Verónica Sasso

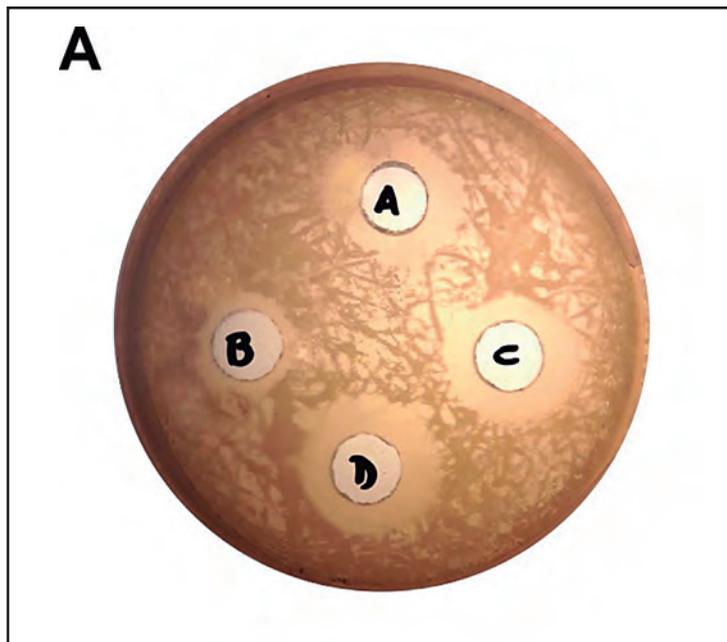


Figura 2 A

que muestran a *Streptococcus dentisani* como una especie novedosa del género *Streptococcus* perteneciente al grupo Mitis, y que podría estar implicado en la modulación y prevención de caries dental, Sasso y col. han demostrado que la presencia de *S. dentisani* en un cultivo de células epiteliales promueve la producción de interleuquinas inflamatorias. Los resultados obtenidos demuestran que la producción de IL-1b de las células en cultivo en presencia de *S. dentisani*, aumenta en función de la carga bacteriana, sin alterar el perfil de expresión de IL-10 (19). Esta modulación ayudaría a comprender la función protectora de *Streptococcus dentisani* dentro de la boca sana, frente a la presencia de patógenos como *S. mutans*. Además, estos resultados ayudarían a clasificar a *S. dentisani*, como agente probiótico. Por lo que este trabajo tiene como objetivo estudiar las propiedades antibacterianas de esta novedosa bacteria, específicamente sobre *S. mutans*.

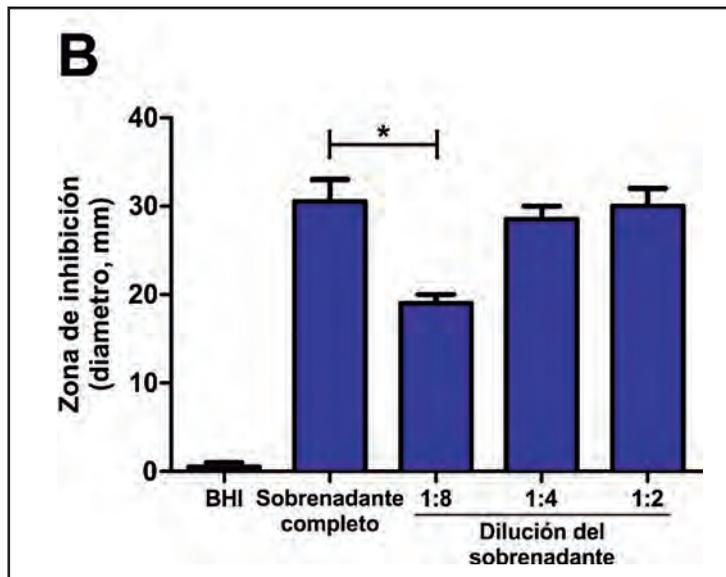


Figura 2 B

Figura 2: Inhibición de *S. mutans* por la presencia del exoproducto de *S. dentisani*. Identificación de la Inhibición de crecimiento de *S. mutans* por presencia de halo inhibición de crecimiento. En Agar ICC se cultiva *S. mutans* y se lo enfrenta a distintas diluciones del exoproducto de *S. dentisani*. (A) Halo de inhibición de crecimiento de *S. mutans*. A: sobrenadante completo, B: dilución del sobrenadante 1:2, C: dilución del sobrenadante 1:4, D: dilución del sobrenadante 1:8. (B) Cuantificación del diámetro de los halos de inhibición. * $p < 0,05$.

MATERIALES Y MÉTODOS

S. dentisani 7746 y *S. mutans* ATCC 25175, se inocularon en 50 ml de caldo de infusión cerebro-corazón (ICC Britania) y se incubaron aeróbicamente a 37°C sin agitar durante toda la noche. Después del crecimiento, se observó la DO⁵⁹⁵ para establecer la fase del cultivo bacteriano. El crecimiento óptimo para las cepas de *S. dentisani* y *S. mutans* para ensayos de inhibición en placa, se logró a partir de cultivos "overnight" en agar infusión cerebro corazón (Agar ICC Britania) a 37°C en aerobiosis. Para la obtención de sobrenadantes de *S. dentisani*, luego de 18 horas después de la inoculación, se realizaron lecturas de densidad óptica seriadas para identificar el momento en que las cepas llegaban a fase estacionaria en cada medio de cultivo. Al alcanzar la fase estacionaria, se detuvo la incubación y se centrifugaron los tubos a 2.500 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido se filtró por membranas de 0,2 µm (Pall Life Sciences®) y luego se realizaron las di-

Streptococcus dentisani y su rol probiótico en el desarrollo de caries dentales

Dr. Rodolfo Matias Ortiz Flores; Od. María Cecilia Porta; Dra. Corina Verónica Sasso

luciones con ICC correspondientes.

Se utilizó el método Kirby-Bauer modificado para los ensayos de difusión en agar. Este consistió en elaborar placas de Agar ICC con el mismo volumen de agar a las cuales se les generó el correspondiente "pocillo" con un sacabocado de un tamaño específico y uniforme, replicado en todos los ensayos subsiguientes.

El diámetro de los halos de inhibición de crecimiento se obtuvo dibujando un círculo imaginario contorno al borde del halo, y se tomaron tres medidas diferentes para disminuir el error de medida.

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism 5.1. Los datos se analizaron mediante ANOVA en combinación con la prueba de Tuckey.

RESULTADOS

Como se puede observar en la Figura 1A, el ensayo de difusión en agar muestra que el cocultivo de *S. dentisani* produjo un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 (Círculo amarillo, borde superior). En contrapartida, cuando *S. dentisani* se incubó en conjunto con ampicilina, esta es incapaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (Ovalo amarillo, borde inferior). La diferencia significativa del diámetro del halo inhibitorio se cuantifica en la Figura 1B.

En la Figura 2A se puede observar cómo el sobrenadante del cultivo de *S. dentisani*, que contiene los exoproductos de la bacteria, produce una inhibición sobre *S. mutans* (A), incluso hasta una dilución de ocho veces (B). Los halos de inhibición encontrados, son cuantificados en la Figura 2B.

En el ensayo de difusión en agar de la Figura 3A, se puede observar cómo en comparación con el sobrenadante del cultivo de *S. dentisani* sin tratar (A), tras el tratamiento con tripsina, el sobrenadante pierde la actividad inhibitoria (B). Esta diferencia de actividad inhibitoria es cuantificada en la Figura 3B.

Tras evaluar los datos en conjunto, se con-

Figura 3 A

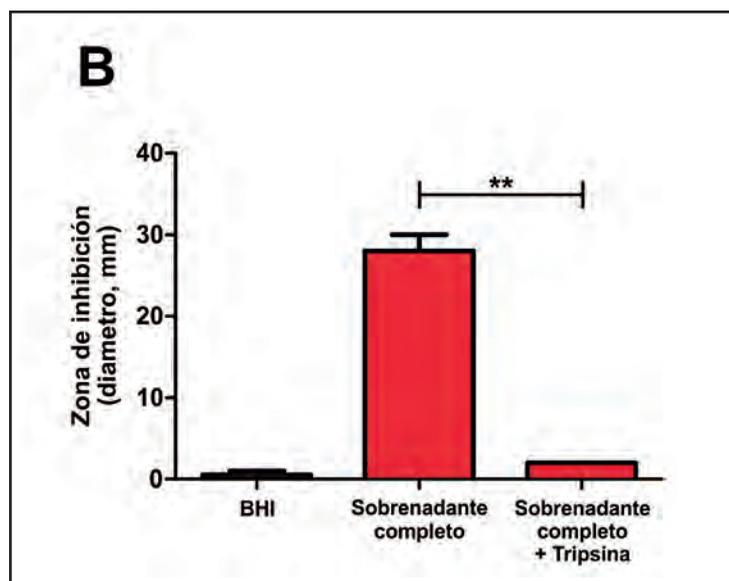
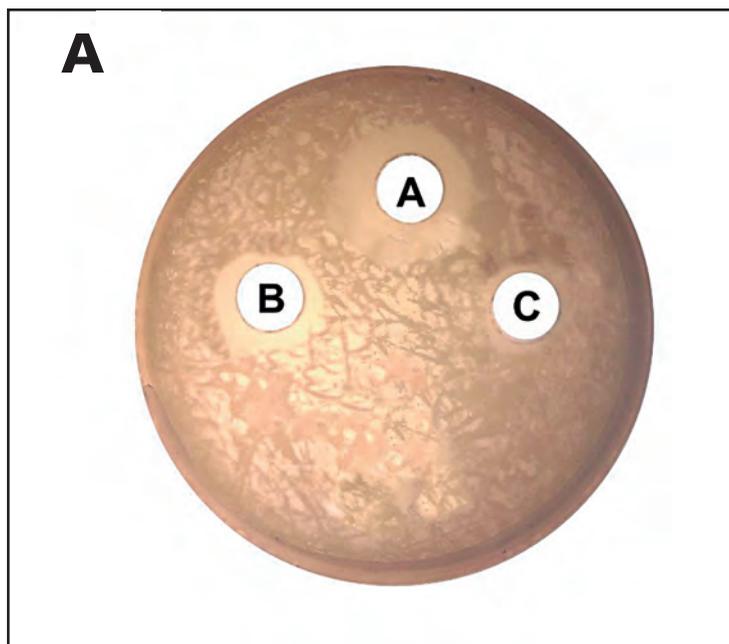


Figura 3 B

Figura 3: Inhibición de *S. mutans* por la presencia del exoproducto de *S. dentisani*. Identificación de la Inhibición de crecimiento de *S. mutans* por presencia de halo inhibición de crecimiento. En Agar ICC se cultiva *S. mutans* y se lo enfrenta al exoproducto de *S. dentisani* en ausencia o presencia de Tripsina. (A) Halo de inhibición de crecimiento de *S. mutans*. A: ausencia de tripsina, B: presencia de tripsina, C: control. (B) Cuantificación del diámetro de los halos de inhibición. ** $p < 0,05$.

Streptococcus dentisani y su rol probiótico en el desarrollo de caries dentales

Dr. Rodolfo Matias Ortiz Flores; Od. Maria Cecilia Porta; Dra. Corina Verónica Sasso

cluye que en presencia de *S. dentisani*, la inhibición del crecimiento de *S. mutans* se debe a la liberación de productos hacia el medio circundante (los que difunden en el agar), y respalda la idea de que *S. dentisani* inhibe el crecimiento de otros estreptococos orales mediante la producción de inhibidores de naturaleza peptídica.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la capacidad de *Streptococcus dentisani* de inhibir el crecimiento de otro estreptococo tanto por su presencia como por medio de aquellos productos que libera al medio exterior. Sasso y col. ya habían demostrado que *S. dentisani* en un cultivo de células epiteliales promueve la producción de interleu-

quinas inflamatorias lo cual generaría un ambiente inmune dispuesto a mantener el equilibrio de la flora microbiológica oral. Esta modulación ayudaría a comprender la función protectora de *Streptococcus dentisani* dentro de la boca sana, frente a la presencia de patógenos como *S. mutans*. Estos resultados aquí mostrados ayudarían a clasificar a *S. dentisani*, como agente probiótico. Los resultados obtenidos también nos permitieron sugerir que las moléculas inhibidoras producidas por *S. dentisani* son de naturaleza peptídica, ya que el efecto inhibidor se redujo significativamente mediante el tratamiento con tripsina. Por ello, el trabajo futuro debe ir encaminado a caracterizar la composición del exoproducto peptídico que *S. dentisani* libera al exte-

rior. Otra alternativa sería la identificación de los genes codificantes de los posibles péptidos para poder estudiar su actividad. Desde el punto de vista aplicado, la caracterización y producción del exoproducto de *S. dentisani* abriría una vía alternativa a la aplicación del probiótico, como sería la elaboración de "cocktails" de péptidos dirigidos a distintas patologías (caries, periodontitis o halitosis), que podrían ser añadidos a productos de higiene dental.

CONCLUSIÓN

Streptococcus dentisani 7746 inhibe el crecimiento de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante su presencia, así como también a través de sus exoproductos presentes en el sobrenadante de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. SIMÓN-SORO A, MIRA A. Solving the etiology of dental caries. (2015). *Trends in Microbiology*, 23(2), 76-82.
2. FEJERSKOV O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. (2004). *Caries Research*, 38(3), 182-191.
3. CAMELO-CASTILLO AJ, MIRA A, PICO A, NIBALI L, HENDERSON B, DONOS N, ET AL. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. (2015) *Front Microbiol*, 6, 119.
4. SCANNAPIECO FA. The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections. (2013). *Clin Microbiol Newsl*, 35(20), 163-169.
5. BADET C, THEBAUD NB. Ecology of *Lactobacilli* in the Oral Cavity: A Review of Literature. (2008). *Open Microbiol J*, 2, 38-48.
6. BEIGHTON D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. (2005). *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 33(4), 248-255.
7. KÖHLER B, BIRKHED D, OLSSON S. Acid Production by Human Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. (1995). *Caries Res*, 29(5), 402-406.
8. DE SOET JJ, NYVAD B, KILIAN M. Strain-Related Acid Production by Oral *Streptococci*. (2000). *Caries Res*, 34(6), 486-490.
9. LOESCHE WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. (1986). *Microbiol Rev*, 50(4), 353-380.
10. HUTTENHOWER C, Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. (2012). *Nature*, 486(7402), 207-214.
11. GOLDSMITH CE, HARA Y, SATO T, NAKAJIMA T, NAKANISHI S, MASON C, ET AL. Comparison of antibiotic susceptibility in viridans group streptococci in low and high antibiotic-prescribing General Practi-
- ces. (2015). *J Clin Pharm Ther*, 40(2), 204-207.
12. KAMIO N, IMAI K, SHIMIZU K, CUENO ME, TAMURA M, SAITO Y, ET AL. Neuraminidase-producing oral mitis group streptococci potentially contribute to influenza viral infection and reduction in antiviral efficacy of zanamivir. (2015). *Cell Mol Life Sci*, 72(2), 357-366.
13. CORBY PM, LYONS-WEILER J, BRATZ WA, HART TC, AAS JA, BOUMENNA T, ET AL. Microbial risk indicators of early childhood caries. (2005) *J Clin Microbiol*, 43(11), 5753-5759.
14. BECKER MR, PASTER BJ, LEYS EJ, MOESCHBERGER ML, KENYON SG, GALVIN JL, ET AL. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. (2002). *J Clin Microbiol*, 40(3), 1001-1009.
15. AAS JA, PASTER BJ, STOKES LN, OLSEN I, DEWHIRST FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. (2005). *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732.
16. HEMPEL S, NEWBERRY SJ, MAHER AR, WANG Z, MILES JN V, SHANMAN R, ET AL. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. (2012). *JAMA*, 307(18), 1959-69.
17. CAMELO-CASTILLO, A., BENÍTEZ-PÁEZ, A., BELDA-FERRER, P., CABRERA-RUBIO, R., & MIRA, A. (2014). *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(1), 60-65.
18. COSTERTON JW. Overview of microbial biofilms. (1995). *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 137-140.
19. SASSO CV, ORTIZ FLORES RM, PORTA C, BERÓN W. Inflammatory properties of *Streptococcus dentisani*. A new ally against dental cavities? (2019). *BIOCELL*, 43(4), 14-15.