

Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica

Knowledge of the microbiota of the oral cavity through the metagenomic

Héctor Alejandro Serrano-Coll¹, Miryan Sánchez-Jiménez², Nora Cardona-Castro³

¹M.D. Estudiante Maestría Medicina Tropical – Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES. E-mail: hectorserranocoll@hotmail.com

²MSc. PhD. Investigadora Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES. E-mail: miryan.sanchez@gmail.com

³M.D. MSc. PhD. Investigadora Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES. E-mail: ncardona@ces.edu.co

Recibido: septiembre de 2014. Aprobado: noviembre de 2015

Resumen

La microbiota oral es uno de los ecosistemas microbianos más antiguos en ser reconocido, y su descripción inicia en 1863 cuando Anton van Leeuwenhoek observa por primera vez en el microscopio a estos microorganismos en placas dentales. En la actualidad, las técnicas de secuenciación y el análisis del genoma a gran escala ha permitido construir bases de datos genómicas, realizar linajes microbianos específicos y conocer que no solamente hacen parte de la microbiota oral humana unos 600 o 700 taxones, sino que se estima que el número de filotipos podrían estar en alrededor de 19000. Todo este conocimiento es una herramienta valiosa para la identificación correcta de las bacterias que están involucradas en complejas biopelículas orales y nos facilitaría así comprender su potencial genético. Además, nos permitiría entender y dilucidar mejor la patología oral, y conocer si los cambios que predisponen a la enfermedad ocurren primero en el huésped o por el contrario a nivel microbiano. En conclusión, el estudio del metagenoma de la microbiota no solo de la cavidad oral es clave para la creación de herramientas diagnósticas y terapéuticas que repercutirán en la calidad de vida de los pacientes. Esta revisión pone en contexto lo que se ha publicado en los últimos años en este tema.

Palabras Clave:

Microbiota oral, metagenómica, cavidad oral, placa dental.

Forma de citar: *Serrano-Coll HA, Sánchez-Jiménez M, Cardona-Castro N.*

Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. Rev. CES Odont 2015; 28(2): 112-118

Abstract

The oral microbiota is one of the oldest microbial ecosystems recognized. The oral microbiota description began in 1863 when Anton van Leeuwenhoek observed, using the microscope, microorganisms in dental plaque. Recently, DNA sequencing and genome analysis have allowed researchers to build large-scale genomic databases, characterize specific microbial lineages, and discover that the human oral microbiota is composed by approximately 600 to 700 taxa and 19000 phylotypes. All this knowledge is a valuable tool for the precise identification of the bacteria that are involved in complex oral biofilms. In addition, the characterization of oral microbiota will allow us to understand different oral pathologies, and to know whether changes that predispose to a disease, occur first in the host or conversely at the microbial level. In conclusion, the study of the metagenome of the oral cavity microbiota is key to develop new diagnostic and therapeutic tools that will improve the quality of the patients life. This review puts into context what has been published in recent years on this subject.

Keywords:

Oral microbiota, metagenomics, oral cavity, dental plaque.

Introducción

La descripción de “animalculus” observados al microscopio en muestras de placa dental humana, contribuyó al desarrollo y descubrimiento de la microbiología. Esos corpúsculos invisibles al ojo humano empezaron a ser estudiados y a ser considerados luego como flora normal o microbiota de la cavidad oral. La microbiota oral es uno de los ecosistemas microbianos más antiguos en ser reconocido, y su descripción inicia en 1863 cuando Anton van Leewenhoek observa por primera vez en el microscopio a estos microorganismos en placas dentales. En la actualidad, las técnicas de secuenciación y el análisis del genoma a gran escala han permitido construir bases de datos genómicas, realizar linajes microbianos específicos y conocer que no solamente hacen parte de la microbiota oral humana unos 600 o 700 taxones, sino que se estima que el número de filotipos podrían estar alrededor de 19000 (1,2).

Esta amplia diversidad microbiana hace que sea importante comprender cómo están constituidas estas comunidades de microorganismos a nivel de la cavidad oral, cómo interactúan y mantienen su homeóstasis en el ser humano, teniendo en cuenta que esta cavidad es la puerta de entrada de posibles infecciones del sistema gastrointestinal y respiratorio. Entender el microbioma oral es una tarea compleja, debido a la gran variedad de hábitats dentro de la mucosa oral. Esta variedad de hábitats en esta mucosa dependen de las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas (3).

Con respecto a la distribución de algunos de estos microorganismos, las especies del género *Streptococcus* se encuentran en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua. Las especies del género *Actinomyces* se encuentran a nivel supra e infragingival y en fisuras de la lengua. Otras

bacterias como *Veillonella parvula* y *Neisseria mucosa* pueden ser aisladas en todos los hábitats orales. También puede existir colonización intracelular en células epiteliales de la cavidad oral por complejos bacterianos constituidos por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (4,5).

Por ende, la mejor herramienta para definir la compleja composición y funciones de estas comunidades microbianas es a través de la metagenómica. Esto se realiza a través de la amplificación del gen 16s rRNA y la secuenciación de los taxones bacterianos más frecuentes, posteriormente las secuencias similares se agrupan en unidades taxonómicas operacionales (OTUS), las cuales se pueden comparar en bases de datos de la subunidad 16s tales como, Silva, Green Genes y RPD. De esta manera, se puede realizar una identificación de forma más precisa de sus relaciones filogenéticas. Estas técnicas genómicas ofrecen una mejor clasificación taxonómica y además, permiten la observación de polimorfismo y de otras secuencias variantes (6,7).

En esta revisión se analizará como la metagenómica ha impactado en el estudio y la comprensión de la microbiota de la cavidad oral.

Comensales de la cavidad oral

En 1863 el microscopista Anthony van Leewenhoek dio a conocer a este nuevo mundo en miniatura. Desde entonces, estos microorganismos se han convertido en un desafío para los investigadores, debido a las dificultades que han encontrado para identificar y caracterizar a la microbiota humana (8). Los seres humanos poseen una microbiota oral dominada por bacterias anaerobias, donde el número de bacterias en la cavidad bucal es de alrededor de bacterias/g de placa dental y bacterias/ml de saliva (9,10).

Estudios poblacionales han utilizado técnicas genómicas basadas en microarrays del gen 16S rRNA y han confirmado que los principales phylum aislados en la cavidad oral son: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteriodes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. También se ha determinado que los géneros bacterianos presentes en ella son: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacterias*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*. Siendo los más frecuentes *Prevotella*, *Selenomonas* y *Streptococcus* (10,11). Esta última se ha reportado como el género preponderante a nivel de esta cavidad y se han diferenciado más de 16 especies de esta bacteria, siendo las más frecuentes *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis* (12,13).

Otras investigaciones basadas en la pirosecuenciación del gen 16S rRNA han estudiado a las comunidades bacterianas con capacidad de reducir nitratos a nivel oral, y han demostrado que los géneros bacterianos más frecuentemente involucrados en la reducción nitratos son: *Veillonella*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*. Además han identificado al género *Veillonella* seguido de *Actinomyces* como los reductores de nitratos más frecuentes en la cavidad oral (14).

La mayoría de estos microorganismos exhiben en la cavidad oral una capacidad simbiótica y una relación con el huésped basada en beneficios mutuos, como es el no causar daños a nivel oral y permitir que las poblaciones comensales puedan mantener a las especies patógenas en jaque al no permitir que se adhieran a las superficies mucosas (8).

Importancia de la metagenómica en el estudio de la microbiota oral

En las últimas décadas se han diseñado técnicas moleculares de análisis que no dependen del cul-

tivo, como son los métodos basados en el estudio del gen 16S rRNA, el cual está presente en todas las bacterias y es lo suficientemente conservado como para poder alinear de forma precisa las posiciones homólogas de unas especies con otras y además, poseen la suficiente variabilidad en determinadas regiones para llevar a cabo los estudios filogenéticos. Por lo tanto el análisis de esta secuencia genética tiene una gran relevancia en el desarrollo de la taxonomía moderna de las células procariotas (15).

Además el continuo desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, han permitido el desarrollo de la metagenómica y la construcción de bases de datos a través de la secuenciación directa de DNA. Por lo tanto, este tipo de plataformas son un método idóneo para un sin fin de estudios a gran escala, imposibles de abordar con ningún otro tipo de tecnología existente hasta la fecha, debido al enorme costo que ello supondría (6).

Los avances de la era genómica han proporcionado a la comunidad científica datos concretos para más de 600 especies bacterianas presentes en la cavidad oral. Uno de los grandes desafíos para esta comunidad es construir una base de datos de los microorganismos presentes en esta cavidad, la cual sería una herramienta valiosa para la identificación correcta de las bacterias que están involucradas en complejas biopelículas orales y comprender así su potencial genético (16). Esta base de datos sería un instrumento que proporcionaría información dinámica no solo de las características taxonómicas, sino que además nos daría información fenotípica, genómica y clínica involucrada en cada taxón, gracias a la secuenciación 16S rRNA y a herramientas BLAST(16).

Con la llegada de la próxima generación de secuenciación (NGS), los investigadores tendrán en sus manos herramientas que permiten perfilar esta

microbiota y sus metagenomas a profundidades sin precedentes, generando así, un crecimiento casi exponencial de datos del microbioma oral, en donde la comprensión de este desbordamiento de datos seguirá siendo un gran desafío y nos llevará en algún momento a desentrañar no sólo el microbioma, si no que se podrá entender la complejidad del interactoma en la vía oral(17).

Papel de la metagenómica en la patología oral

La aplicación de técnicas genómicas ha permitido generar nuevos conocimientos sobre la relación entre la microbiota, la salud dental y la enfermedad oral, en la cual se piensa que los factores que tienen un impacto directo en el desarrollo de la caries son la adherencia en las superficies dentales (formación de biopelículas), la producción de ácido y su tolerancia. Los intentos por definir los agentes etiológicos específicos involucrados en la caries dental han demostrado ser difíciles de identificar, apoyando así, la idea de que la caries es quizás una patología compleja y multifacética (18).

Uno de los elementos principales para la aparición de la caries es la formación de biopelículas, cuya formación es dinámica y compleja y es generada por una multitud de especies bacterianas, lo que produce una superficie dura a nivel del diente. La formación de estas biopelículas a nivel oral está mediada por colonizadores bacterianos primarios como *S. gordonii*, *S. sanguinis* y *S. mitis*. Además, la maduración de la biopelícula implica la adición de colonizadores tardíos formados principalmente por anaerobios y bacterias Gram negativas (18,19). Recientemente la clonación y secuenciación del gen 16S rRNA, se ha utilizado para caracterizar las biopelículas de cavidad oral y ha permitido identificar en estas estructuras, comunidades microbianas de más de 700 biotipos e inclusive dominios de bacterias o Arqueas. A partir de estos datos genómicos se conoce que una biopelícula puede estar compuesta por 691 taxones de los cuales 344

están identificados, 112 han sido cultivados pero aún no identificados y 232 de estos filotipos todavía no son cultivados (16,17).

La secuenciación de estos taxones orales ha permitido demostrar que los miembros más representativos de todas las especies investigadas son: *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *A. naeslundii* y *P. gingivalis*, siendo ésta una característica común de las bacterias comensales a nivel oral (20,21).

También es importante mencionar que otros estudios basados en la piro secuenciación del gen 16S rRNA en individuos con placa dental, han demostrado que la caries dental en estos pacientes se ha relacionado con otros géneros bacterianos como *Dialister*, *Oligotropha*, *Basfia*, *Parvibaculum* y *Syntrophus* (22).

Por lo tanto, la metagenómica es una herramienta básica para el entendimiento de la patología oral, dado que ella nos permite dilucidar si estos cambios que predisponen a la enfermedad ocurren primero en el huésped o por el contrario a nivel microbiano. En conclusión, estas técnicas permitirán al ARNm convertirse a futuro en un biomarcador más importante de enfermedad oral (23,24)

Discusión

Es de resaltar que los avances en técnicas genómicas han permitido visualizar microorganismos nunca antes estudiados y que eran desconocidos hasta este momento. Por lo tanto, el conocimiento y entendimiento de estas comunidades microbianas no solo permiten construir bases de datos de los microorganismos que están alojados en la cavidad oral sino que también se convierten en

una estrategia relevante a la hora de entender la patología oral y nos pondría un paso por delante de esta. Permitiendo de esta manera impactar en la salud oral de nuestros pacientes.

Aunque se sabe que aún falta un largo camino por recorrer en el conocimiento de este fascinante mundo microbiológico, el avance meteórico en técnicas ómicas nos garantiza que en un futuro cercano se podrían concretar proyectos de metagenómica a gran escala.

Conclusiones

En la actualidad, la metagenómica ha impactado de tal manera a la ciencia que ha hecho posible generar proyectos inimaginables para la humanidad en décadas pasadas, como lo es el proyecto microbioma humano, el cual permitirá a nivel de la cavidad oral analizar y comprender las complejas comunidades e interacciones de los microorganismos de esta microbiota.

Las técnicas genómicas también permitirán conocer cómo se da la interacción entre el sistema inmune del huésped con la microbiota oral y explicar su relación con la salud o la enfermedad oral. Este conocimiento llevará a los odontólogos a convertir al microbioma oral en una herramienta clínica habitual para conocer la susceptibilidad de sus pacientes de padecer ciertas enfermedades orales.

El estudio del metagenoma de la microbiota no solo de la cavidad oral es clave para la creación de herramientas diagnósticas y terapéuticas que repercutirán en la calidad de vida de los pacientes. Es por esto que Gilbert et al concluyen, "debemos mirar lo más pequeño e ignorado para entender nuestro futuro en este planeta" (7, 25).

Referencias

1. Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol.* 2011;13(12):3077-3087.
2. Walker AW, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 2014;22(5):267-274.
3. Zaura E, Keijsers B, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy «core microbiome» of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009;9:259.
4. Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dent Res J.* 2014;11(3):291-301.
5. Díaz-Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 2012; 5(1):40-45.
6. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002808.
7. Gilbert JA, Dupont CL. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annu Rev Mar Sci.* 2011;3: 347-371.
8. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8):405-411.
9. Carroll IM, Threadgill DW, Threadgill DS. The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 2009;20(7):395-403.
10. Barroso E. Interacciones de los polifenoles del vino con microbiota de la cavidad bucal [Internet]. Universidad Autónoma de Madrid; 2011 [citado 24 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: <http://hdl.handle.net/10261/60946>
11. Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol.* 2012;12:144.
12. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005;13(12):589-595.
13. Luo AH, Yang DQ, Xin BC, Paster BJ, Qin J. Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition. *Oral Dis.* 2012;18(6):595-601.
14. Hyde ER, Andrade F, Vaksman Z, Parthasarathy K, Jiang H, Parthasarathy DK, et al. Metagenomic analysis of nitrate-reducing bacteria in the oral cavity: implications for nitric oxide homeostasis. *PLoS One.* 2014;9(3):e88645.
15. Latorre-Castillo A, D'Auria G, Peris-Bondia F. Fraccionando la microbiota gastrointestinal humana [Internet]: universitat de València; 2012. <http://roderic.uv.es/handle/10550/24147>

16. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database J Biol Databases Curation*. 2010;2010:baq013.
17. Zaura E. Next-generation sequencing approaches to understanding the oral microbiome. *Adv Dent Res*.2012;24(2):81-85.
18. Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ, Bretz WA. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J*.2011;61 Suppl 1:11-22.
19. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*. 2006;42:47-79.
20. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*. 2013;47(2):89-102.
21. McLean JS. Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:98.
22. Alcaraz LD, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. Identifying a healthy oral microbiome through metagenomics. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*.2012;18 Suppl 4:54-57.
23. Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio*. 2014;5(2):e01012-4.
24. Soro V, Dutton LC, Sprague SV, Nobbs AH, Ireland AJ, Sandy JR, et al. Axenic Culture of a Candidate Division TM7 Bacterium from the Human Oral Cavity and Biofilm Interactions with Other Oral Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(20):6480-6489.
25. Genti S. Metagenomics: beyond the genome of the microorganisms. *Bitácora digital [Internet]*. 2013 [citado 25 de agosto de 2014]; Recuperado a partir de: www.revistas.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/download/.../6031



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia

Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007