



UPV EHU



X Congreso Nacional de la Sociedad Española de Odontología Infantil Integrada

“La alimentación en la salud general y bucodental”

Variabilidad genética de *Streptococcus mutans*: ¿influenciada por la dieta?

Carletto Körber Fabiana Pía; Mourelle Martínez María Rosa;
González-Ittig Raúl E; Vera Noelia S; Martínez Juan;
Jiménez María Graciela; Cornejo Lila Susana.

Subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de Córdoba. Resolución SECyT N°: 203/2014.

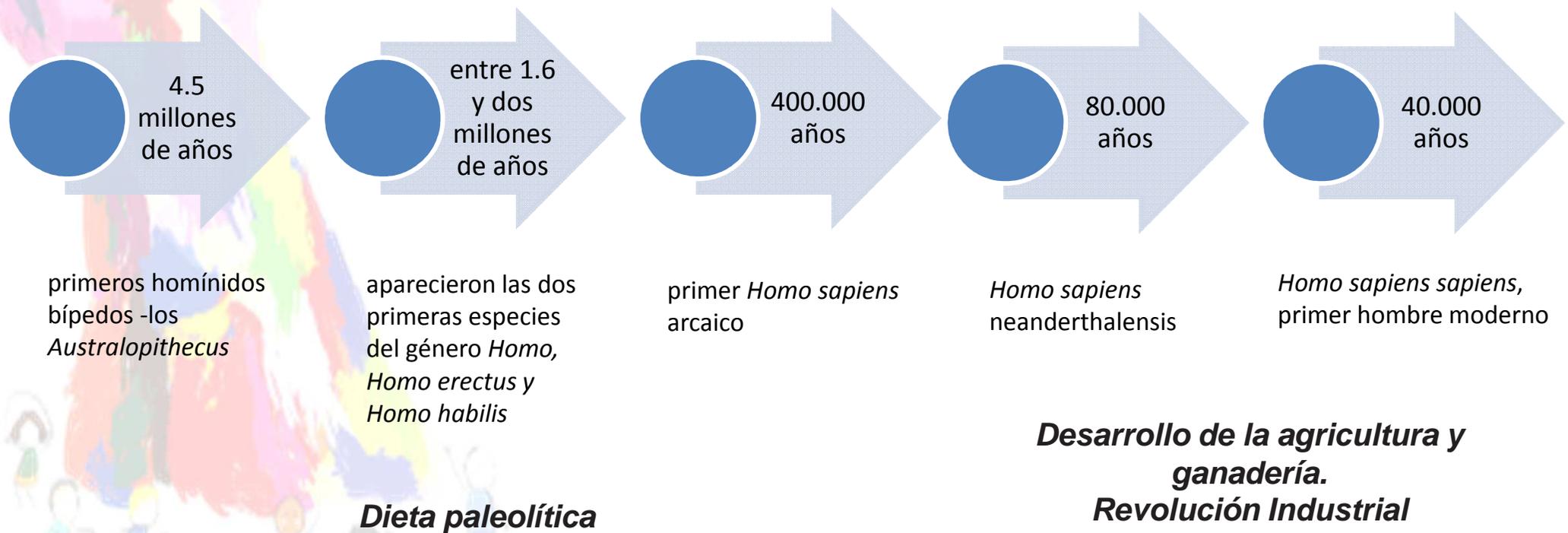




INTRODUCCIÓN

La alimentación en la evolución del hombre

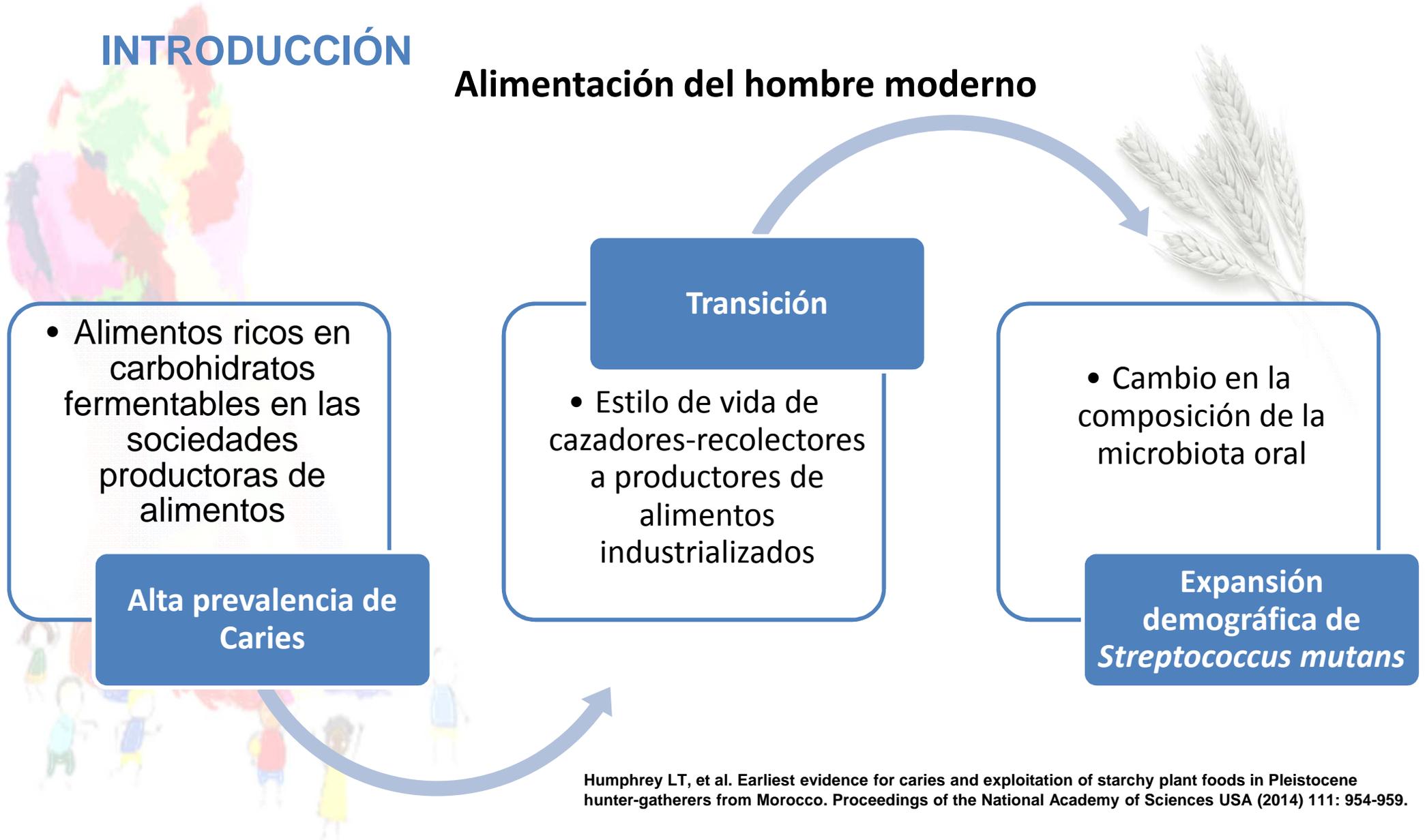
Cronología de los procesos evolutivos





INTRODUCCIÓN

Alimentación del hombre moderno

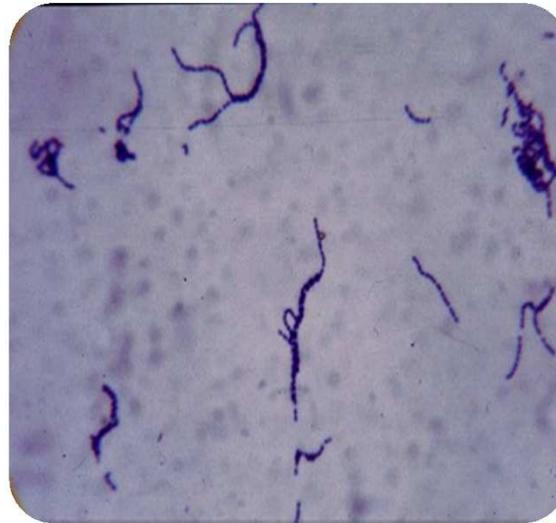


Humphrey LT, et al. Earliest evidence for caries and exploitation of starchy plant foods in Pleistocene hunter-gatherers from Morocco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2014) 111: 954-959.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus mutans

- Es una de las bacterias de mayor distribución mundial relacionada con la caries dental.



- Se encuentra en el ecosistema bucal formando parte de la biopelícula.

- Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares e intracelulares.

INTRODUCCIÓN

- La aparición de nuevas enfermedades o su re-emergencia, pone de manifiesto cambios en la epidemiología de los patógenos.
- En general, no se conocen las causas de por qué algunos clones bacterianos son patogénicos mientras que otros no lo son.

Maynard-Smith et al. 1993. How clonal are bacteria? Proc Natl Acad Sci USA 90:4384-4388.

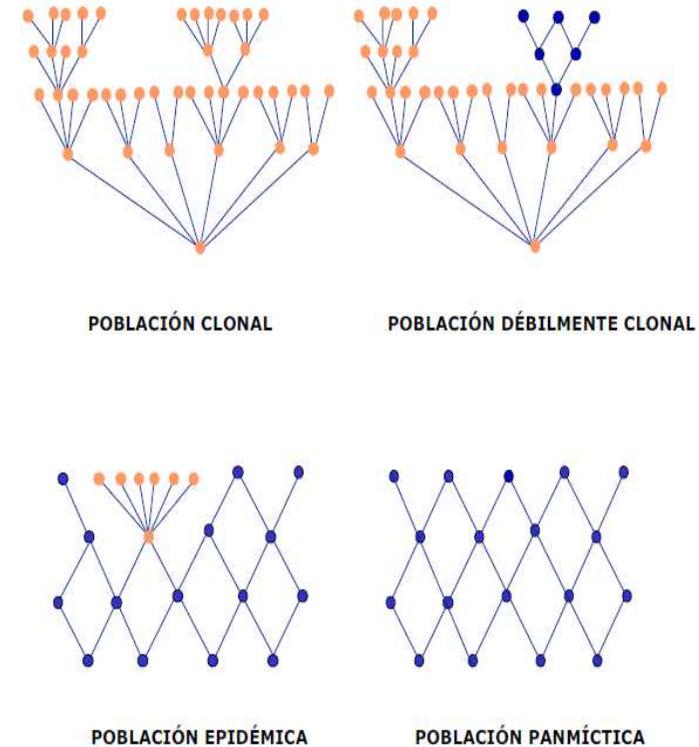


Figura tomada de Tesis de Doctorado Microbiología Aplicada. Estudio de la estructura genética de poblaciones de *Vibrio Cholerae*. Universitat de Barcelona.

- Se han realizado estudios genético poblacionales previos, con resultados contradictorios, utilizando técnicas como MLST (multilocus sequence typing) o con el secuenciamiento de todo el genoma bacteriano.



OBJETIVO

- Estimar si la estructura genética poblacional de *Streptococcus mutans* es clonal o recombinante.
- Evaluar los niveles actuales de flujo génico y el tipo de ancestría de las cepas.
- Inferir si el momento en que se produjo la expansión de *S. mutans* coincide con la dispersión de la agricultura y el cambio a una dieta rica en carbohidratos.



LUGARES DE TRABAJO

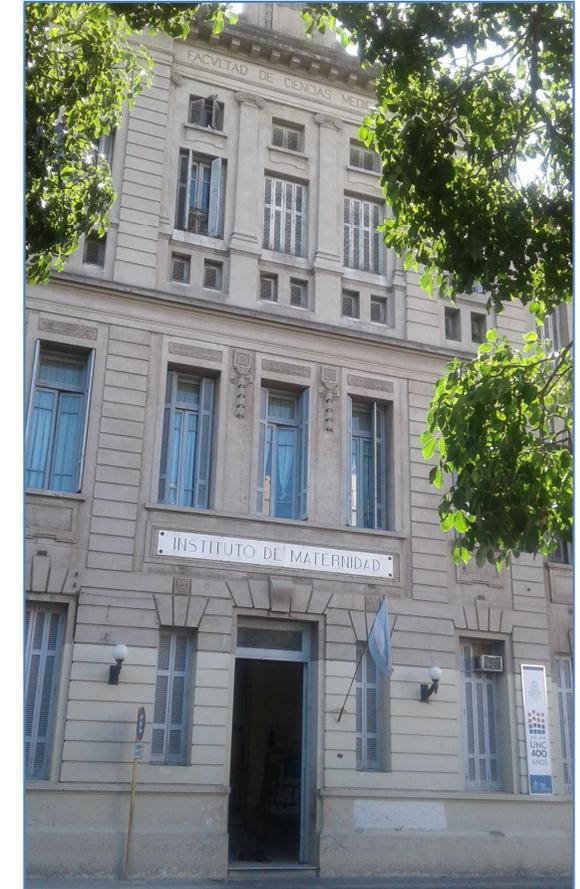
Universidad Nacional de Córdoba - Argentina



➤ Facultad de Odontología



➤ Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales



➤ Facultad de Ciencias
Médicas

MÉTODO

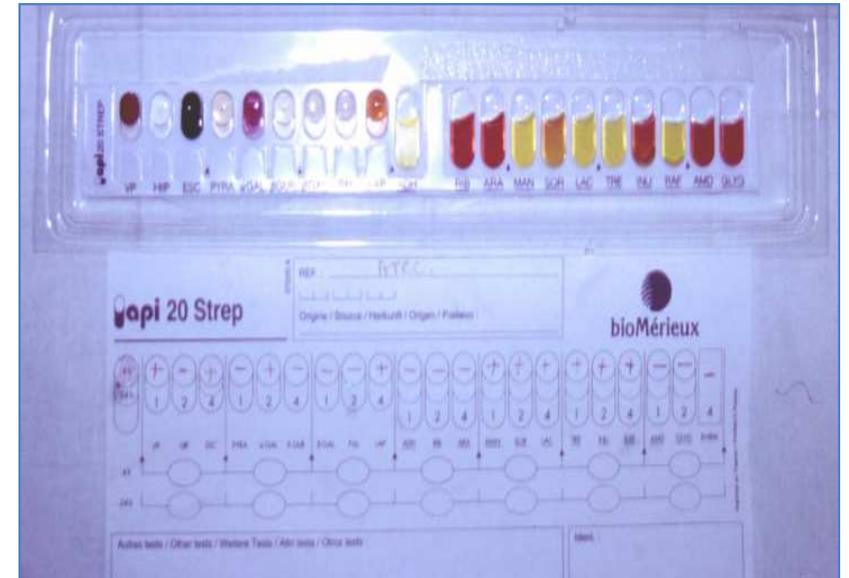
- **Aislamiento y tipificación de cepas de *S. mutans* (n=40) de muestras de saliva y biopelícula dental.**



Mitis Salivarius Agar (DIFCO)



Gram stain and optical microscopy



API 20 Strep kit, BioMérieux, l'Etoile, France

- **Extracción de ADN de *S. mutans* por el método de Bollet, purificado con fenol cloroformo isoamílico. (25:24:1; Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina)**

MÉTODO

- **Amplificación por PCR de los genes**

aroE (codifica shikimate 5-dehidrogenasa)

lepC (codifica signal peptidasa I)

gltA (codifica glutamate synthasa)

gyrA (codifica DNA girasa subunit A)

- **Mezcla de reacción (vol. 25 µl)**

Buffer (Ferm)	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
dNTP _s	0,25 µl
Taq (Ferm)	0,15 µl
BSA	1 µl
H ₂ O	15 µl
ADN	1 µl

- **Condiciones de ciclado**

Desnaturalización inicial 94°C 5 min.

37 ciclos: 94°C 30 seg.

55°C 30 seg.

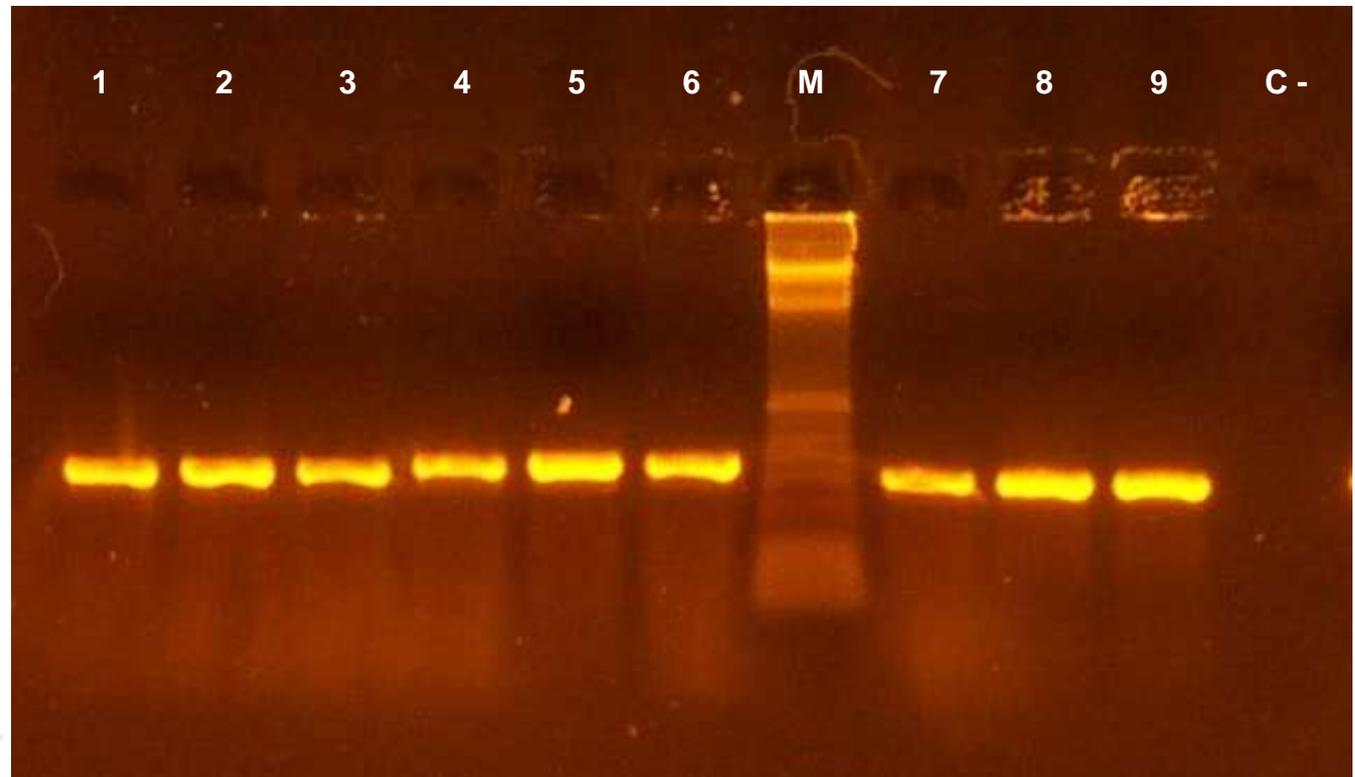
72°C 30 seg.

Extensión final 72°C 5 min.



MÉTODO

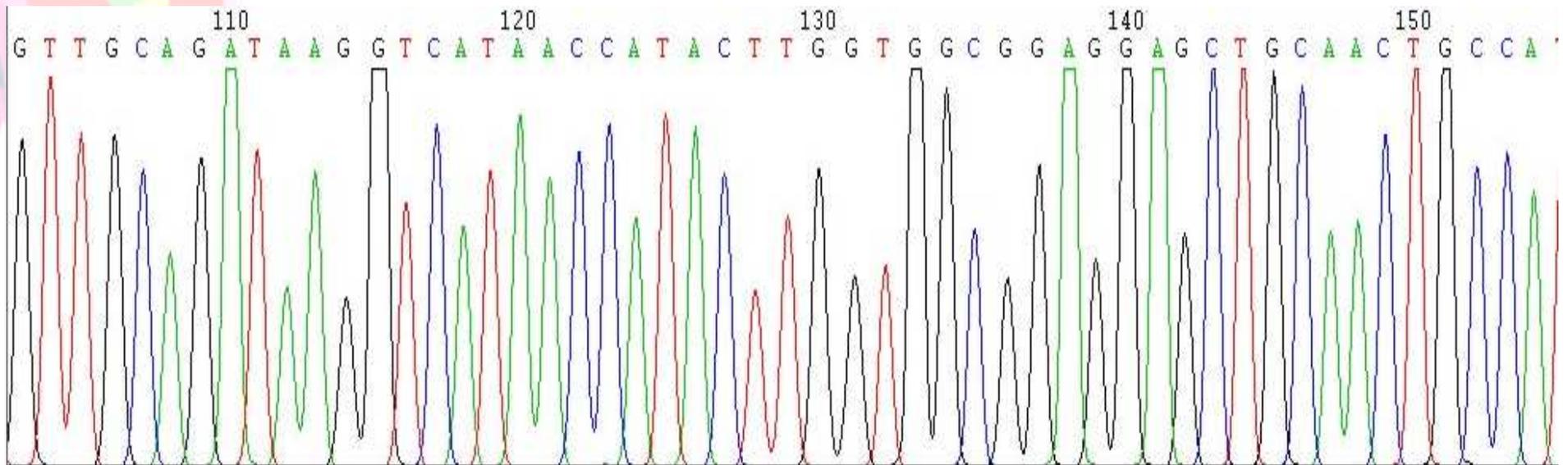
- Foto de productos de PCR



- Secuenciación en Macrogen (Corea del Sur) (<http://www.macrogen.com>)

MÉTODO

- Las secuencias de Córdoba-Argentina (n=40) fueron alineadas con las disponibles en el GenBank de Japón (n=89), Tailandia (n=52) y Finlandia (n=12). Nakano et al. (2007) y Lapirattanakul et al. (2011)



Matriz total de ADN de *S. mutans* n=193

- El análisis conjunto de los haplotipos de los 4 genes permitió la detección de “sequence types” (STs).
- Se estimó el F_{ST} de a pares entre países.

MÉTODO

Análisis estadístico

Evidencia de recombinación entre las STs

- a) Se calculó el test de homogeneidad de particiones con PAUP4b10 (Swofford, 2003). La prueba se llevó a cabo mediante comparaciones de a pares de genes: lepC vs. gltA, lepC vs. gyrA, lepC vs. aroE, gltA vs. gyrA, gltA vs. aroE y gyrA vs. aroE.
- b) Se calculó el índice de homofasia (PHI) de a pares de genes con el programa SplitsTree4.0 (Huson y Bryant, 2006).
- c) Con el programa DnaSP 5.10.1 (Librado y Rozas, 2009) se estimó número mínimo de eventos de recombinación.
- d) El grado de clonalidad se estimó mediante el cálculo del índice de asociación (IA) de Maynard-Smith et al., (1993) con el programa START2 (Jolley et al., 2001) y mediante el índice de asociación estandarizado IAS con LIAN3.5 (Haubold y Hudson, 2000).
- e) La identificación de linajes o complejos clonales se realizó con el programa eBURST (Feil et al., 2004) y se obtuvo un árbol de Neighbor-joining con el programa START2 (Jolley et al., 2001).



MÉTODO

Análisis estadístico

Inferencias genético-poblacionales

- a) Para examinar el grado de diferenciación entre las cepas de *S. mutans* de Argentina, Finlandia, Japón y Tailandia se estimó el F_{ST} (un estimador de la varianza en frecuencias alélicas y diferenciación genética entre países). Para este cálculo se utilizó el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Los índices de variabilidad estándar también se calcularon con el mismo programa.
- b) Se determinó el número de grupos genéticos y la ancestría de cada una de las cepas con el programa Structure 2.3.4 (Falush et al., 2007).
- c) Para estimar los cambios en el tamaño efectivo poblacional en los últimos 10.000 años se realizó el análisis Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) con el programa Beast v1.8.1 (Drummond et al., 2012). Estos análisis se realizaron con una tasa de mutación de 245 subst/mil años y un punto de calibración de 20 mil años.



RESULTADOS

Caracterización genética

Tabla 1: Número de alelos (Na), Número de sitios polimórficos (Np), Estadística D y Fs, Diversidad STs y Diversidad nucleotídica (π) de las cepas de *S. mutans*

Países	n	Na	Np	D	Fs	Diversidad de STs	π
Argentina	40	35	42	-1.1446 ns	-25.1327**	0.9897 +/- 0.0097	0.0041 +/- 0.0021
Tailandia	52	35	49	-0.8044 ns	-17.6274**	0.9849 +/- 0.0063	0.0051 +/- 0.0026
Japon	89	68	68	-1.2921 ns	-24.761**	0.9862 +/- 0.0058	0.005 +/- 0.0026
Finlandia	12	12	34	-0.4511 ns	-4.888*	1.0000 +/- 0.0340	0.0062 +/- 0.0034
Total	193	137	98	-1.597*	-24.4584**	0.9941 +/- 0.0016	0.005 +/- 0.0026

1 ST (19) compartido por Argentina, Japón y Tailandia,
4 STs (12, 15, 18 y 27) compartido por Argentina y Japón,
5 STs (49, 55, 58, 65 y 68) entre Japón y Tailandia
2 STs (STs: 86 y 92) entre Japón y Finlandia



RESULTADOS

Análisis de recombinación

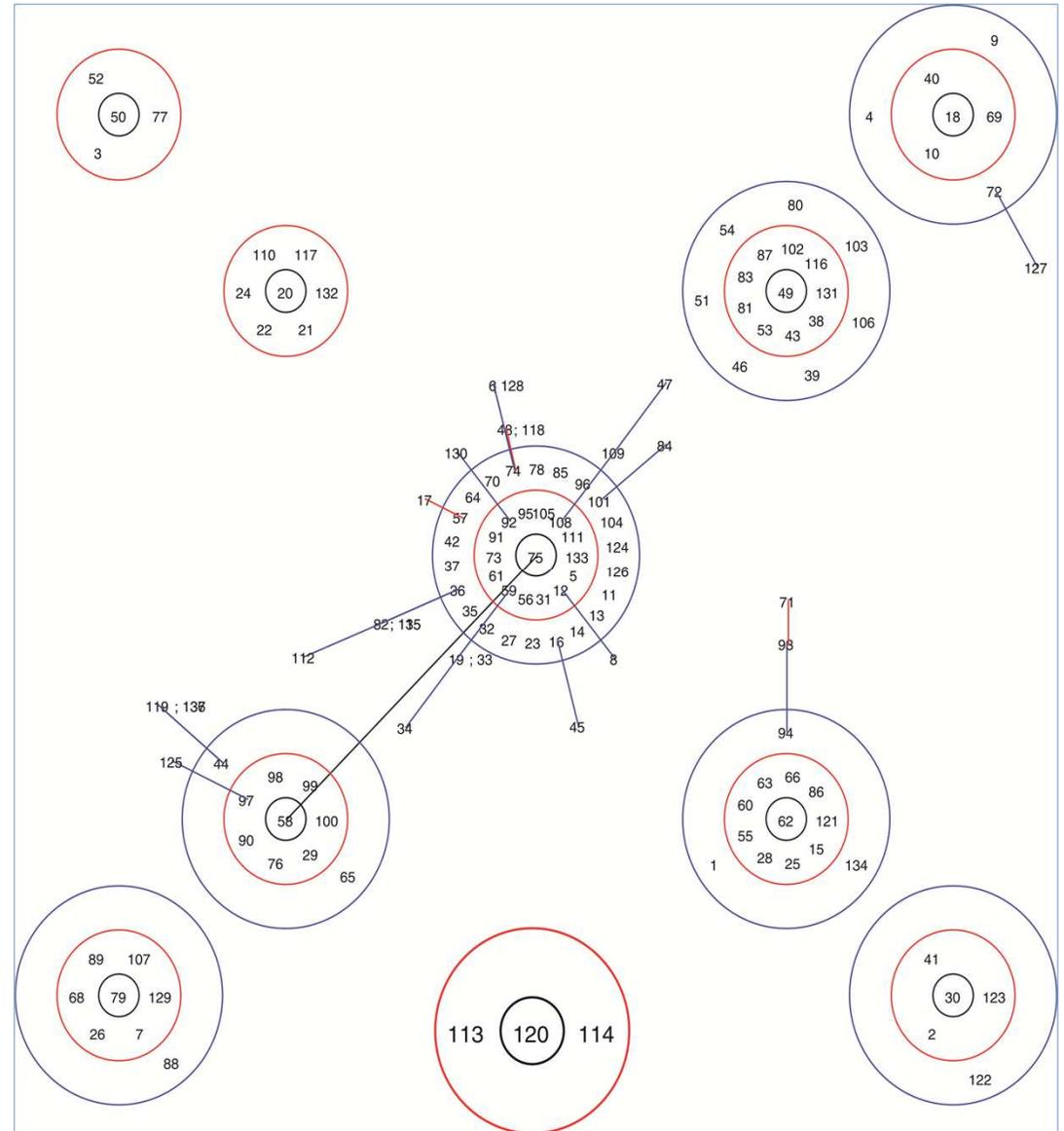
Tabla 2: Análisis estadísticos para evaluar el grado de recombinación en cepas de *S. mutans*

Análisis Estadístico	Valor / p
Test de homogeneidad (ILD)	P <0,05
Índice de Homofasia (PHI)	P <0,001
Número mínimo de eventos de recombinación	13 (137 ST)
Grado de clonalidad Índice I _A	0,0413 No significativo
Grado de clonalidad índice I _A S	0,0103 No significativo

RESULTADOS

Caracterización genética y análisis de recombinación

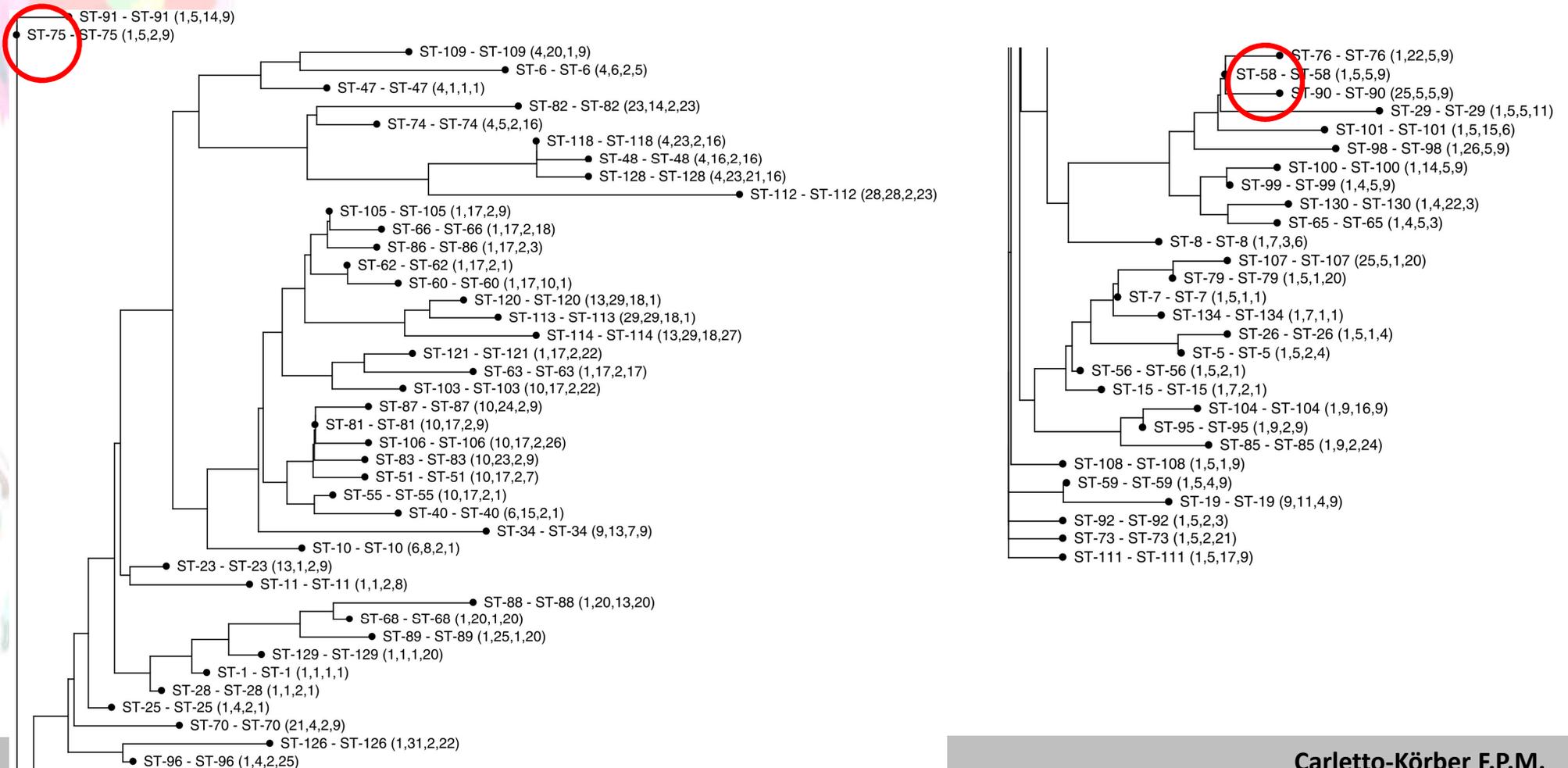
Figura 1: Complejos clonales de *S. mutans* obtenidos con el programa eBURST



RESULTADOS

Caracterización genética y análisis de recombinación

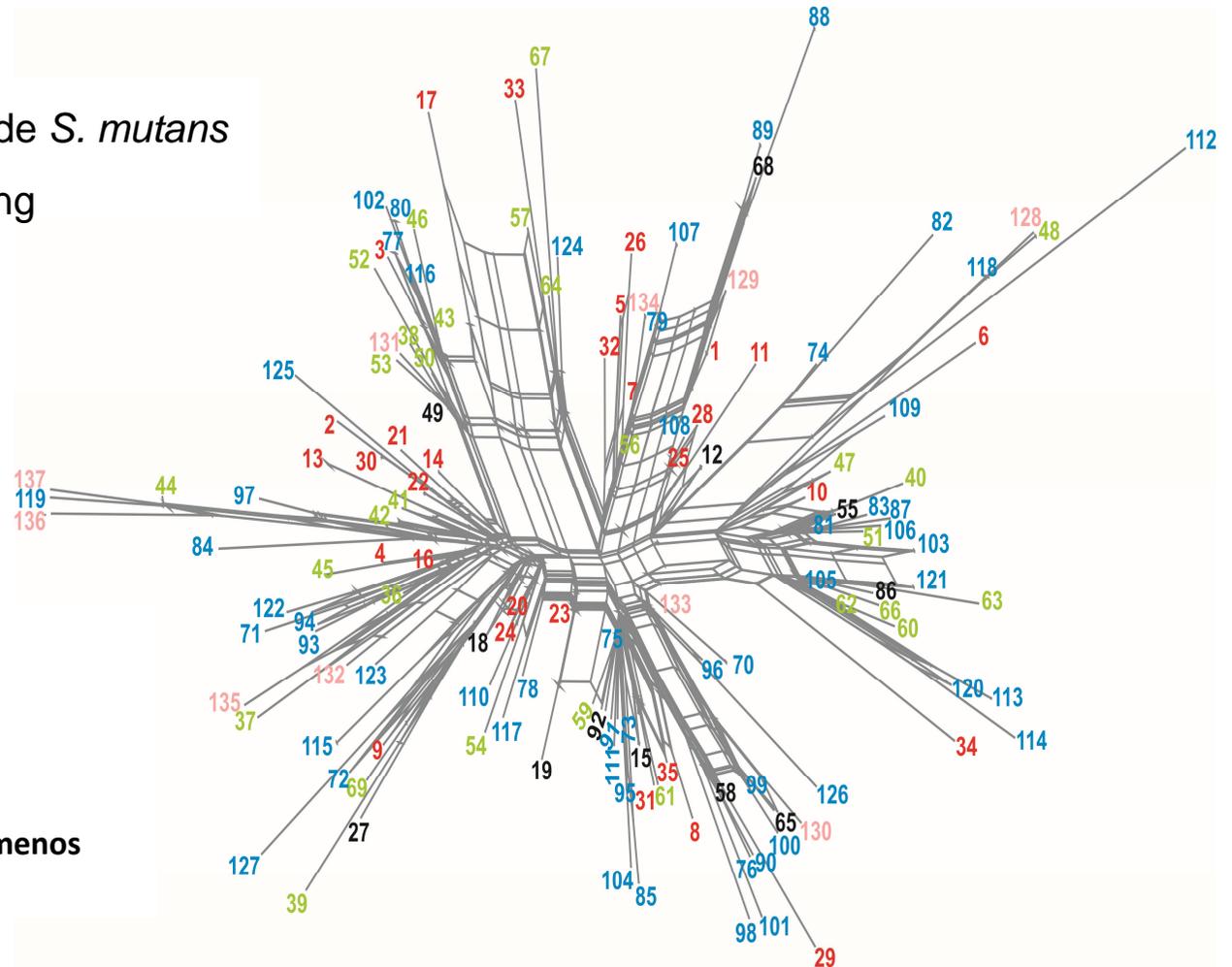
Figura 2: Recorte de un árbol de Neighbor-joining obtenido con el programa STAR2 que relaciona a cepas de *S. mutans*



RESULTADOS

Caracterización genética y análisis de recombinación

Figura 3: Neighbor-Net de las 137 STs de *S. mutans* basado en cuatro genes de housekeeping



Colores de la etiqueta para las ST:

- rojo = Argentina
- verde = Tailandia
- azul = Japón
- rosa = Finlandia
- negro: STs compartidos por al menos dos países



RESULTADOS

Estructura genética de *Streptococcus mutans*

Tabla 3: Comparación de los F_{ST} de países de a pares sobre las 193 cepas de *S. mutans*

	Argentina	Tailandia	Japón	Finlandia
Argentina	-			
Tailandia	0.035**	-		
Japón	0.022*	0.037**	-	
Finlandia	0.02	0.009	0.006	-

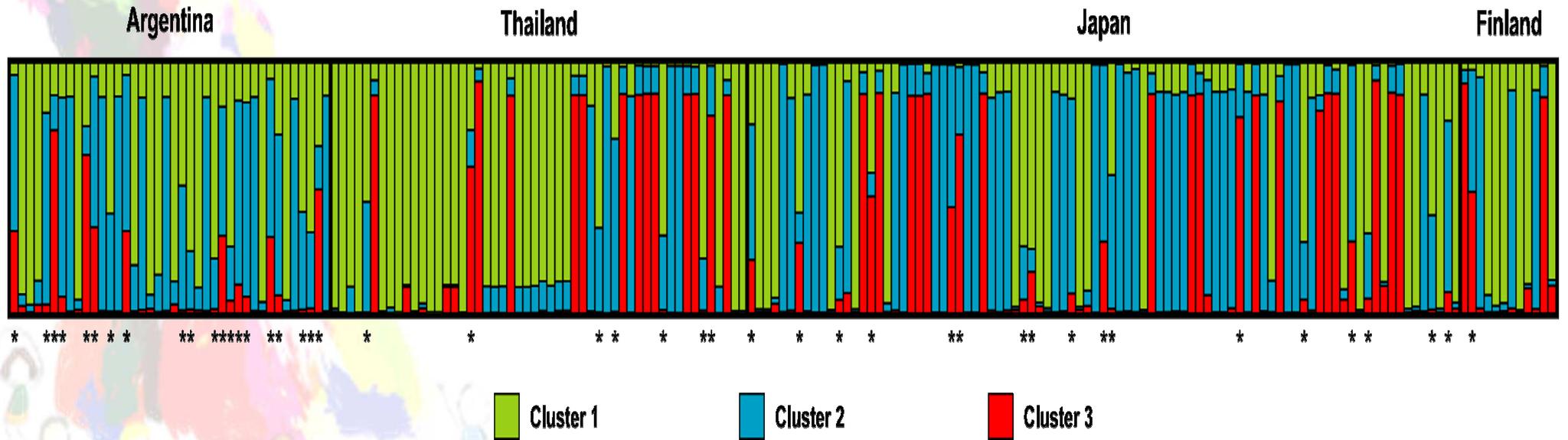
*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Programa Arlequin)



RESULTADOS

Estructura genética de *Streptococcus mutans*

Figura 4: Análisis de agrupamiento bayesiano de cepas de *S. mutans* de Argentina, Tailandia, Japón y Finlandia. Cada cepa dentro de un país está representada por una línea vertical delgada, dividida en segmentos que representan la probabilidad de pertenencia a uno de los tres grupos genéticos estimados

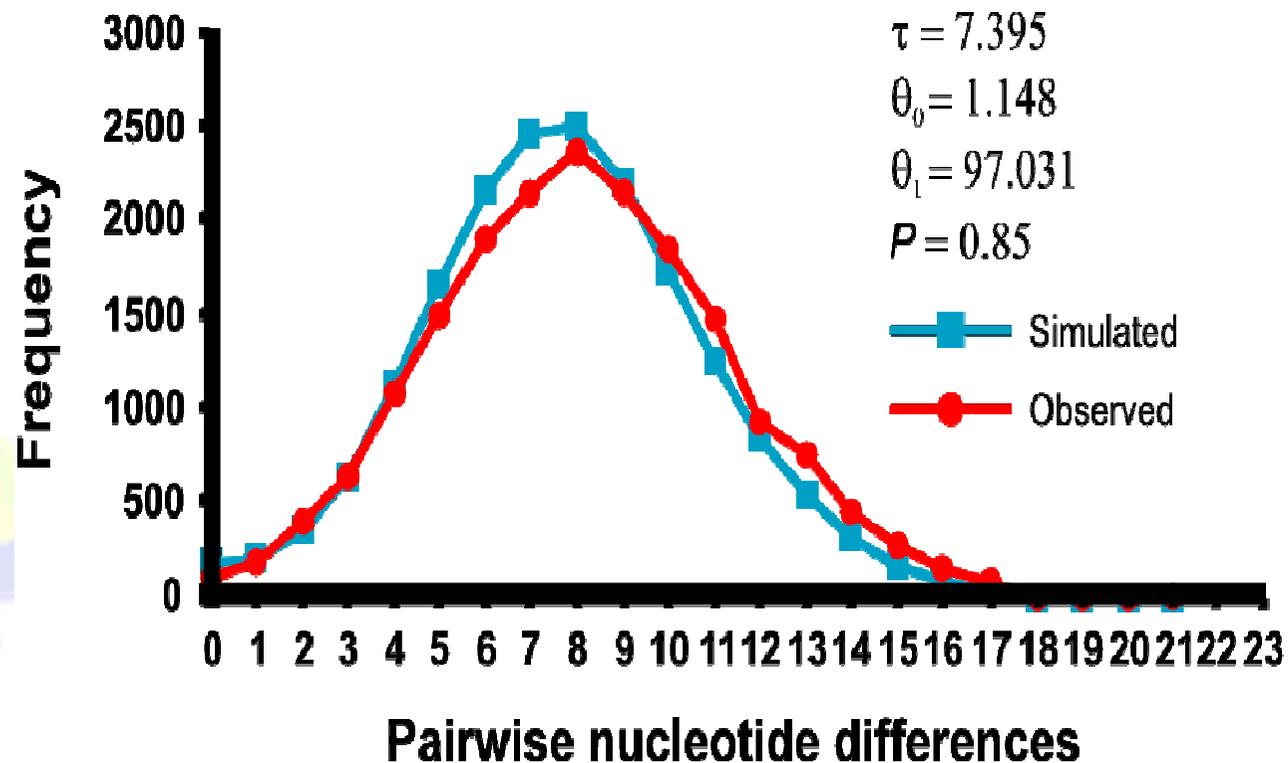


*: Cepas con ancestría mixta

RESULTADOS

Estructura genética de *Streptococcus mutans*

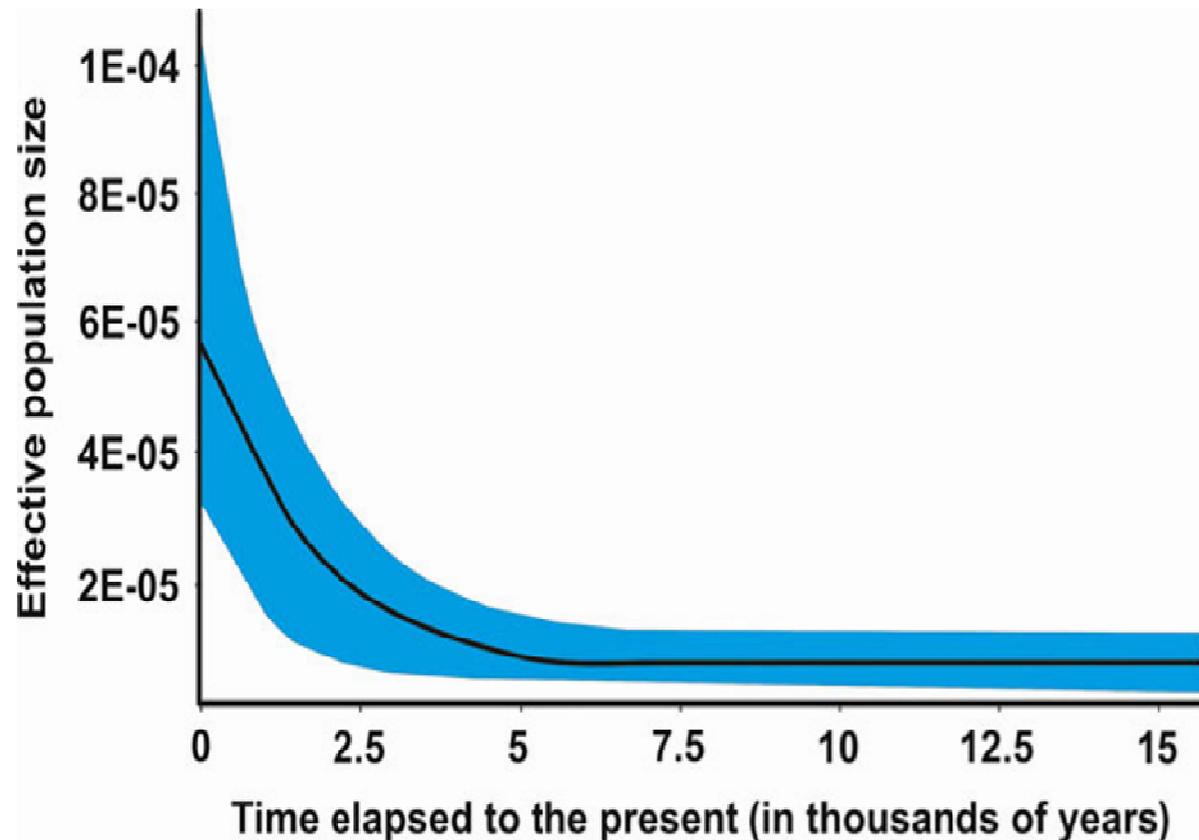
Figura 5: Distribución de frecuencia de las diferencias en pares de las secuencias concatenadas de los genes *aroE*, *gltA*, *gyrA* y *lepC* obtenidos a partir de 193 cepas de *S. mutans*.



RESULTADOS

Estructura genética de *Streptococcus mutans*

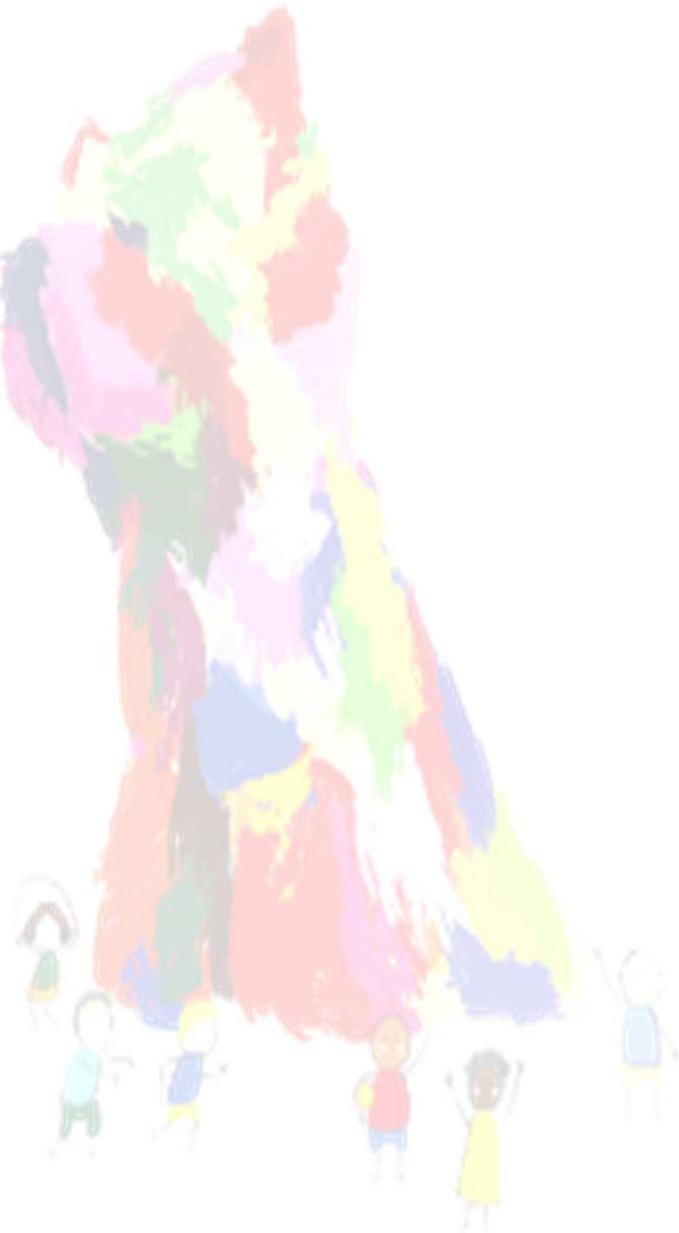
Figura 6: Extended Bayesian Skyline Plot representa la historia demográfica de *S. mutans* en los últimos miles de años





DISCUSIÓN

Estructura genética de *Streptococcus mutans*:
¿recombinante o clonal?





Variabilidad genética de *Streptococcus mutans*: ¿influenciada por la dieta?

DISCUSIÓN

Nakano et al. 2007
Streptococcus mutans clonal variation revealed by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 45: 2616-2825

**89 cepas de Japón
12 de Finlandia**

Clonal

Lapirattanakul et al. 2011.
Multilocus sequence typing analysis of Streptococcus mutans strains with the *cnm* gene encoding collagen-binding adhesin. J Med Microbiol 60(11),1677-1684.

52 cepas de Tailandia

Do et al. 2010. Generation of diversity in Streptococcus mutans genes demonstrated by MLST. PLoS ONE 5:e9073.

**135 cepas de Japón,
Brasil, Sudáfrica, USA,
Reino Unido, Turquía,
Nueva Guinea, Islandia
y China.**

Recombinante

Cornejo et al. 2013.
Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria Streptococcus mutans. Molecular Biology and Evolution 30: 881-893.

**57 cepas de *S. mutans*:
Brasil (n=16), UK (n=29),
Iceland (n=5), Hong Kong (n=2),
South Africa (n=2), Turkey (n=2),
USA (n=1)**

González-Ittig et al. 2017. Population genetic structure and demographic history of *Streptococcus mutans* (Bacteria: Streptococcaceae). Biol J Linn Soc. 120 (3): 705-716. DOI: <https://doi.org/10.1111/bij.12904>

**193 cepas de *S. mutans*: 40 cepas de
Argentina, 89 de Japón, 52 de Tailandia y
12 de Finlandia**



DISCUSIÓN

Estructura genética poblacional e historia
demográfica





DISCUSIÓN

Cornejo et al. (2013) sugieren que *S. mutans* comenzó a expandirse exponencialmente aproximadamente hace 10000 años, coincidiendo con el inicio de la agricultura humana.

Adler et al. 2013. la expansión demográfica de *S. mutans* puede haber ocurrido por dos cambios en la dieta, uno que implica la dieta rica en carbohidratos asociados a la agricultura y la otra relacionada con el reciente desarrollo de la harina y el azúcar procesados industrialmente.

Expansión demográfica de *S. mutans*

Humphrey et al., 2014. restos óseos humanos del pasado; en general los humanos cazadores-recolectores presentan muy bajos niveles de caries, mientras que en sociedades donde se incorporó la agricultura y por ende una dieta rica en carbohidratos, las caries aumentan notablemente

González-Ittig et al. 2017. la especie experimentó una expansión de la población hace unos 5000 años, en un momento coincidente con el establecimiento y la difusión de la agricultura.



CONCLUSIÓN FINAL

- La estructura genética poblacional de *Streptococcus mutans* es de tipo recombinante.
- Los análisis demográficos apoyan la hipótesis de que esta bacteria experimentó una expansión poblacional en los últimos 5.000 años.
- El alto número de cepas recombinantes en Argentina estaría reflejando las grandes oleadas migratorias humanas, desde diversas regiones geográficas, ocurridas en los siglos XIX y XX.





Muchas gracias!!!

