

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FÍSICAS Y QUÍMICAS
AREA DE BIOQUÍMICA

**“DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMO EN EL
OPERON *cdt* (CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN) EN
AISLADOS DE
Actinobacillus actinomycetemcomitans
PROVENIENTES DE PACIENTES COLOMBIANOS
CON ENFERMEDAD PERIODONTAL”**

Felipe Andrés Astorga Mori

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. Rubén León Berríos.**

**Santiago-Chile
2005**

Dedicado a:

Dios, mi Madre, mi Hermana, mi Padre y mis Amigos...

AGRADECIMIENTOS.

Debo dar mis Primeros agradecimientos a Dios... gracias a él y solo a él, estoy terminando mi carrera... aunque en algunos momentos haya creído que no me ayudaba o no me entendía.

En Segundo lugar debo agradecer y dedicar, no solo mi tesis, sino que también lo que soy como persona y futuro profesional, a mi madre Ana Maria, mi hermana Carolina, mi padre Luís y mi primo... el Negro... Gracias por estar siempre ahí en la idas y venidas de esta vida... por darme su amor, apoyo y alegría incondicional... por todos los momentos vividos... desavenencias, enseñanzas, penas y alegrías... por poner orden en mi vida y siempre darme la libertad para escoger... la libertad de pensar y de exigirme para dar lo mejor de mi.

En Tercer lugar debo agradecer y dedicar mi trabajo a mis amigos... mas bien llamados Hermanos... Ariel, Kto , Víctor, Nacho, Andrea B., Trini y Paty... al igual que mi familia, han estado en los momentos mas importantes de mi vida... Gracias por los momentos de alegría, sabiduría, sencillez, esparcimiento, compañerismo y tristeza... por esos aportes objetivos y sencillos que han dado e impregnado a lo largo de mi vida... y obviamente los momentos infaltables de carrete.

En Cuarto lugar debo agradecer a mi gran maestro... el Dr. Rubén León Berrios... Gracias Rubén por todo... tu apoyo incondicional, tu capacidad de enseñar, tu confianza, tu mirada objetiva de las cosas, tu gran paciencia y sencillez... por acompañarme en este camino, que al final ha dado muy buenos frutos... se ha formado una nueva amistad.

En Quinto lugar agradecer a mi Universidad, mi gran Universidad de Chile... como dice el comercial... Única, Grande y Nuestra, a todas las personas que en ella conocí... Profesores, Asistentes de Clínica, Funcionarios (tanto en la escuela nueva, como vieja) y a mis compañeros de curso... mis amigos de carrera... Arnoldo, Palito, Pablo, Yahir, Rodrigo,

Gustavo, Gonzalo, Claudio, Rolando, Nano... con los cuales compartí lo que llamamos vida universitaria.... Gracias por hacer de la universidad un lugar entretenido, en donde se puede reír y pasar bien... al igual con las niñas... siempre tan generosas de cariño y afecto... el verlas, hacia aún mas grata esta estadía en la universidad... les agradezco srta. Andrea B., Liset C., Vale D, Rosario G.H., Coke A., Maria José C, Tamara O, Daniela L, Marisol O... Gracias por su cariño y su amor... las recordare siempre.

Finalmente debo agradecer a mi Colegio, el gran Colegio San Ignacio, gracias a su formación me siento un profesional distinto... es por eso que ahora me siento con la oportunidad de decir.... "Entre para aprender y ahora salgo para servir..." ...Gracias totales.

Felipe Andrés Astorga Mori.

INDICE.

INDICE	4.
INTRODUCCIÓN	5.
MARCO TEÓRICO	9.
HIPÓTESIS	23.
OBJETIVO GENERAL	24.
OBJETIVO ESPECÍFICO	24.
MATERIALES Y MÉTODOS	26.
RESULTADOS	31.
DISCUSIÓN	40.
CONCLUSIONES	45.
RESUMEN	46.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48.
APÉNDICE Nº 1	59.
APÉNDICE Nº 2	61.

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) corresponden a enfermedades de naturaleza infecciosa y serían causadas por algunos de los microorganismos presentes en la placa bacteriana ubicada en la región del surco gingivo-dentario ^(1, 2, 3, 4). Estas enfermedades se caracterizan clínicamente, en una primera instancia, por inflamación gingival y sangramiento, para luego avanzar hacia una pérdida de inserción de los tejidos de soporte con formación del saco periodontal, destrucción de hueso alveolar, progresando hacia la movilidad dentaria y pérdida de la pieza dental ^(5, 6).

Una característica de este grupo de enfermedades es la presencia de microorganismos anaerobios, los cuales han sido señalados como los agentes etiológicos de las enfermedades periodontales. La mayoría corresponde a bacterias anaerobias Gram(-), que colonizan el área subgingival, se organizan secuencialmente en la invasión y se potencian entre si. De las más de 500 especies que se encuentran en la microbiota oral se han descrito entre 8 a 12 especies involucradas en la etiología de la enfermedad periodontal, algunas de ellas son: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromona gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*,

Fusobacterium nucleatum, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros* y algunas especies de *Capnocytophaga*.

Dentro de este grupo de microorganismos *A. actinomycetemcomitans* ha sido considerado como uno de las bacterias que juega un rol importante en la etiología de la enfermedad periodontal humana (7, 8, 9). Este periodontopatógeno ha sido relacionado principalmente con la periodontitis de tipo agresiva y se han reconocido actualmente seis serotipos que han sido designados por las letras a, b, c, d, e y f (10, 11, 12). No se ha determinado de que manera *A. actinomycetemcomitans* es capaz de causar la patogénesis. Se ha descrito que este microorganismo posee una serie de factores de virulencia que podrían estar involucrados en ese proceso. Entre estos factores tenemos: producción de colagenasas (13, 14) y lipopolisacaridasas (15), así como factores citotóxicos. Entre los factores citotóxicos la leucotoxina ha sido uno de los más estudiados (16, 17). Además, recientemente se ha descrito otro factor de citotoxicidad, la citolethal distending toxin, ella inhibe específicamente el ciclo celular de fibroblastos, queratinocitos y linfocitos T y B (18, 19). Esta toxina es codificada por tres genes que forman parte de un operón llamado *cdt*, constituido por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. La holotoxina CDT es una molécula tripartita, compuesta por tres subunidades (CDTA, CDTB y CDTC). Se ha descrito que CDTB posee actividad DNAsa y provocaría daño en el DNA genómico de la célula eucarionte, esto activaría a las proteínas que participan en los checkpoints

del ciclo celular, deteniéndolo en la etapa de G2/M. La detención en esta etapa induce posteriormente la entrada de las células en apoptosis (18, 22, 23, 24).

Por otra parte, se propone que el rol de CDTA y CDTC es el facilitar la entrada de CDTB a la célula blanco, puesto que esta última no puede unirse por sí sola a las células (57, 58). Hay autores que demuestran que estas subunidades permiten la interacción entre la toxina y la superficie celular (24). Es así, como se ha encontrado CDTA en la membrana plasmática de células eucariontes (18, 57).

En Latinoamérica no se han realizado análisis tendientes a caracterizar cepas de *A. actinomycetemcomitans* que produzcan esta toxina. La literatura señala que existen diferentes cepas de este microorganismo que presentarían polimorfismo en la región del DNA que contiene a este operón, encontrándose en algunos casos, cepas que no poseen los genes que codifican esta holotoxina, y en otros, diferencias a nivel de los patrones de restricción de las regiones que rodean al operón *cdt*, determinando, aparentemente, diferencias a nivel de la producción de esta toxina (24, 25).

El presente trabajo de investigación se enmarca en el desarrollo de un proyecto en conjunto entre el laboratorio de Medicina Periodontal de la Universidad del Valle, ubicada en la ciudad de Calí, Colombia y el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. En él se están caracterizando a nivel genético

molecular los factores de virulencia que posee la bacteria *A. actinomycetemcomitans*, y el objetivo de esta investigación consiste en la determinación de la prevalencia de los genes *cdt* en 80 aislados de este microorganismo. También, se determinará si existe polimorfismo en los fragmentos de restricción en los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, luego de ser amplificados por PCR, utilizando como molde el DNA genómico obtenido de los aislados que posean el operón *cdt*.

MARCO TEÓRICO.

Las enfermedades que afectan al periodonto, vale decir encía, ligamento periodontal y hueso alveolar, constituyen un grupo heterogéneo de patologías en donde se observan diferencias que van desde la etiología hasta el grado de complejidad de cada una de ellas ⁽²⁶⁾. Clínicamente, estas enfermedades se caracterizan por inflamación gingival y sangramiento, avanzando hacia una pérdida de inserción de los tejidos de soporte con formación del saco periodontal, destrucción de hueso alveolar, llevando en forma progresiva hacia la movilidad dentaria y pérdida de la pieza dental ^(5, 27).

En términos generales, la periodontitis se puede subdividir en dos formas: periodontitis crónica y periodontitis agresiva, cada una de las cuales se puede presentar en las variantes localizada o generalizada ^(28, 29). Estas, fueron definidas en el International Workshop del año 1999, que fue dedicado a lograr un consenso para una nueva clasificación de las enfermedades periodontales ⁽²⁸⁾.

De acuerdo a lo anterior, la periodontitis crónica se define como una enfermedad infecciosa que causa inflamación en los tejidos de inserción y soporte del diente, con pérdida de inserción epitelial conectiva y destrucción de hueso alveolar. Esta forma de periodontitis es la que ocurre con mayor frecuencia y, aunque se puede iniciar a cualquier edad, se manifiesta

principalmente en adultos. Se caracteriza por una consistencia entre la destrucción observada y la presencia de factores locales coadyuvantes, por lo que el cálculo subgingival es un hallazgo frecuente. Presenta tasas en la progresión de la pérdida del nivel de inserción de bajas a moderadas, pero también podemos tener períodos de rápido progreso; todo esto asociado con patrones microbiológicos variables. La periodontitis crónica puede ser clasificada en base a extensión y severidad, además se han descrito factores de riesgo tales como: diabetes mellitus, el tabaquismo y estrés (28, 29).

La periodontitis agresiva por su parte, es una forma de periodontitis que se caracteriza por presentar una rápida pérdida de inserción y destrucción ósea, de alrededor de 2mm por año. Se describe la presencia de agregación familiar y también se ha observado que las cantidades de tártaro son inconsistentes con la severidad de la destrucción tisular. Además, se ha determinado, en algunas poblaciones humanas, que existe una asociación entre la periodontitis agresiva y la presencia de cantidades elevadas de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (28, 71).

Clasificación de las Enfermedades Periodontales.

Se han descrito diferentes tipos de enfermedades periodontales, las cuales fueron reclasificadas en el año 1999, por la Academia Americana de Periodoncia (AAP). En esta clasificación podemos distinguir: a) las enfermedades gingivales, que pueden ser o no inducidas por placa bacteriana, b) la periodontitis crónica que puede ser localizada o generalizada; c) la periodontitis agresiva que, también se divide en localizada o generalizada; d) la periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, entre las que se encuentran las enfermedades periodontales ulcero-necrotizantes; e) los abscesos del periodonto, f) las periodontitis asociadas a lesiones endodónticas, y g) las condiciones y deformidades del desarrollo ó adquiridas ⁽³⁰⁾.

Dentro de las enfermedades más prevalentes podemos encontrar la gingivitis, la periodontitis crónica y la periodontitis agresiva.

Signos y síntomas de las enfermedades periodontales más prevalentes.

1. Entre los signos comunes de todas las enfermedades gingivales se distinguen:

- 1.1 Inflamación limitada exclusivamente a la encía, caracterizada por aumento de volumen y enrojecimiento de los tejidos.
- 1.2 Aumento del exudado crevicular.
- 1.3 Sangramiento espontáneo o provocado, según la severidad.
- 1.4 Reversibilidad de la enfermedad al remover el factor etiológico.
- 1.5 Presencia de placa bacteriana que inicia o exacerba la enfermedad ⁽²⁶⁾.

2. La periodontitis por su parte, es una enfermedad crónica de los tejidos de soporte vascularizados del diente⁽³¹⁾, que se caracteriza por:

- 2.1 Inflamación gingival.
- 2.2 Pérdida del nivel de inserción clínica.
- 2.3 Pérdida de hueso alveolar.
- 2.4 Formación del saco periodontal, que es la característica anátomo-patológica de dicha enfermedad.

En el tejido periodontal afectado por la periodontitis, se forma un infiltrado inflamatorio constituido por distintas células, entre las cuales se destacan los linfocitos T y macrófagos. El proceso inflamatorio se produce como respuesta a la presencia de placa bacteriana específica. La activación de mecanismos protectores y defensivos del hospedero (como: enzimas y citoquinas), puede llevar a la destrucción de los tejidos del hospedero. Por lo tanto, las bacterias son en gran medida las responsables de la pérdida de tejido en la periodontitis. Esto va generando progresivamente una disminución del soporte de la pieza dentaria, hasta que finalmente se pierde (5, 27, 32).

2a. En cuanto a la periodontitis crónica, se dice que es la más frecuente de las periodontitis, dentro de sus características destacan:

2a.1 Es más prevalente en adultos, pero puede afectar tanto a niños como a adolescentes.

2a.2 El grado de destrucción de los tejidos es consistente con la presencia de factores locales.

2a.3 El cálculo subgingival es un hallazgo frecuente.

2a.4 Se puede asociar a un patrón microbiológico variable.

2a.5 Su tasa de progresión varía entre baja y moderada, existiendo períodos de rápida progresión.

La periodontitis crónica puede subclasificarse, como ya habíamos mencionado, según la extensión y la severidad del daño. A su vez puede ser modificada, tanto por factores locales y enfermedades sistémicas, como por otros de diversa índole, entre los cuales se encuentran el estrés y el tabaco.

2b. Por otro lado, la periodontitis agresiva es un tipo específico de periodontitis, claramente identificable a través de hallazgos clínicos y de laboratorio. A diferencia de la periodontitis crónica, los pacientes se observan clínicamente sanos, no hay evidencias claras que demuestren que están en un estado de enfermedad periodontal. Las características generales son:

- 1- Rápida pérdida de inserción y destrucción periodontal.
- 2- La progresión de la pérdida de inserción y de la pérdida ósea puede ser autolimitada.
- 3- Se observa un patrón de agregación familiar.
- 4- Depósitos microbianos inconsistentes con la severidad de las lesiones.
- 5- En algunas poblaciones humanas se presenta con cantidades elevadas de *A. actinomycetemcomitans* (Aa) y/o *P. gingivalis* (Pg).

- 6- Pueden presentar además, anomalías fagocitarias, macrófagos con fenotipo hiper-responsivo con altos niveles de prostaglandina E2 y de interleukina 1-B.

Es necesaria la presencia de varias de estas características (aunque no todas) para diagnosticar este tipo de enfermedad periodontal ^(27, 71).

Ha sido ampliamente aceptado que el inicio y progresión de la enfermedad periodontal depende de la presencia de microorganismos capaces de producir la enfermedad. De las más de 500 especies bacterianas que pueden colonizar la cavidad oral, alrededor del 2,5% parecen estar involucrados en la enfermedad periodontal ^(2, 4, 9). Estas bacterias son principalmente anaerobias Gram negativas, que no forman parte de la microbiota comensal de la cavidad oral. Entre ellas se destacan: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, bacteroides pigmentados de negro como *Porphyromona gingivalis* y *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*, especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter rectus*, *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, entre otros. De ellos, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. dentícola* y *T. forsythia* son considerados como agentes etiológicos primarios de la enfermedad periodontal. De estos últimos, *A. actinomycetemcomitans* ha sido implicado en la periodontitis juvenil localizada (actualmente enfermedad periodontal

agresiva) y se han descrito una serie de factores de virulencia que podrían dar cuenta de este microorganismo como un agente patógeno ⁽⁹⁾.

Características generales de *A. actinomycetemcomitans*.

A. actinomycetemcomitans es un pequeño coco bacilo no motil, Gram negativo, que crece sólo, en pares o pequeños grupos y que se describe como un microorganismo anaerobio facultativo, microaerofílico y capnofílico. En condiciones experimentales, crece preferentemente en un medio con 5% de CO₂ a 37° C ^(10, 33), y el rango de pH óptimo para su crecimiento es de 7.0 a 8.0 ^(10, 33). En medio líquido esta bacteria forma gránulos translúcidos aislados que se adosan a las paredes y al fondo del tubo, dejando el líquido sobrenadante limpio. En medio sólido la bacteria crece formando colonias pequeñas translúcidas, de aproximadamente 1 mm. de diámetro. Estas colonias poseen un borde irregular y la colonia se adhiere fuertemente a la superficie del agar. Al ser observadas bajo el microscopio ó la lupa las colonias suelen presentar en el centro una apariencia semejante a una estrella. Por otra parte, *A. actinomycetemcomitans* presenta 2 tipos de textura en su superficie, un fenotipo liso (asociado a la pérdida de las fimbrias) y un fenotipo rugoso (asociado a la conservación de sus fimbrias) ^(34, 35). Las colonias rugosas, a diferencia de las lisas, poseen una mayor adhesión a la hidroxiapatita y a la película salival ⁽³⁶⁾.

El hábitat natural de *A. actinomycetemcomitans* es la cavidad oral humana y de otros mamíferos ^(8, 10, 37). Dentro de la cavidad oral ha sido aislado de diferentes zonas, entre las que se encuentran: la placa supragingival, placa subgingival, saliva, mucosa de mejilla, mucosa bucal, encía, lengua (por sus caras dorsal y lateral), paladar duro y amígdalas ^(37, 38). Este microorganismo se puede encontrar en cavidades orales de pacientes sanos, así como de pacientes que presentan enfermedad periodontal ⁽⁷⁾.

Diversidad Serológica de *A. actinomycetemcomitans*.

De acuerdo a las características de inmuno reactividad del LPS, se han caracterizado 6 serotipos en este microorganismo, los que han sido nombrados desde el a al f. El antígeno inmuno dominante es una molécula de alto peso molecular, llamada polisacárido O la cual corresponde a una parte del lipopolisacárido (LPS) ⁽¹²⁾. Los polisacáridos O de los serotipos b, c, e y f son el producto de grupos de genes homólogos, algunos de estos grupos, contienen entre 10 (serotipo e) y 16 (serotipo b) genes que son altamente conservados. En la región central, de cada grupo, se encuentran genes únicos, los cuales tienen bajos contenidos de guanina-citocina. Por otra parte, los grupos de genes que determinan los serotipos a y d no están relacionados estructuralmente con los otros 4 grupos de genes que definen

los polisacáridos O para los serotipos b, c, e y f ^(39, 40, 41, 42). El gen para el serotipo d está ubicado en un fragmento de 13,9kb, aproximadamente a 2 kb río abajo del grupo de genes para los serotipos b, c, e y f. El serotipo a está codificado en un fragmento de 12,9 kb del DNA genómico lejos de los grupos de genes que determinan los otros serotipos.

Se han realizado múltiples análisis en diferentes poblaciones de seres humanos para lograr determinar la distribución individual de serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Estos análisis han dado como resultado que los individuos tienden a ser colonizados por un único serotipo y genotipo de esta bacteria ^(7, 43, 44). El serotipo b se ha encontrado fuertemente asociado a pacientes que sufren enfermedad periodontal ^(7, 44) y, el serotipo c ha sido encontrado más frecuentemente en individuos portadores ⁽⁷⁾.

***A. actinomycetemcomitans* y su acción Inmuno-supresora.**

Una serie de trabajos recientes han determinado que la bacteria suprime activamente, tanto la inmunidad adquirida, como la inmunidad innata ⁽⁴⁵⁾. Las toxinas bacterianas están siendo cada vez más relacionadas con el mecanismo de inhibición del sistema inmune ^(5, 46).

En *A. actinomycetemcomitans* se describen 2 toxinas inmunomoduladoras:

- a) Una Leucotoxina ⁽⁴⁷⁾, codificada por el gen *ItxA* el que pertenece a un operón que posee otros tres genes llamados *ItxB*, *ItxC* y *ItxD*. Su actividad inmunomoduladora esta basada en la capacidad de formar canales en la membrana de las células a las cuales afecta, generando un proceso de lisis osmótica. Adicionalmente, tiene la capacidad de inducir apoptosis.

Esta Leucotoxina produce lisis de células de la serie linfoide y mieloide, tanto de humanos, como de primates ^(10, 48). La toxina es selectiva a estas células, por que existe una unión mediada por receptor Integrina- β 2 y ligando LFA-1 ^(10, 49).

Dentro de los efectos que genera esta toxina están:

- Promueve la degranulación de los neutrofilos, incluyendo la liberación de proteínas colagenolíticas de la matriz extracelular, como la metaloproteinasa (MMP-8), en bajas concentraciones ^(16, 50).
- Inhibe la fagocitosis ^(51, 52).
- Incrementa los niveles de Calcio intracelular ⁽⁵³⁾, que a altas concentraciones produce la lisis celular in Vitro ⁽⁵³⁾.
- Perturba la función mitocondrial, lo que estaría directamente relacionado con la inducción de apoptosis celular ⁽¹⁷⁾.

b) La otra toxina inmunomoduladora, descrita recientemente, es llamada cytolethal distending toxin (CDT) y esta codificada en un operón compuesto por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Esta molécula pertenece a una familia de proteínas que es posible encontrar en otras especies bacterianas, tales como: *Escherichia coli*, *Haemophilus ducreyi*, especies de los géneros *Campylobacter*, *Shigella* y *Helicobacter* ⁽¹⁰⁾. La toxina CDT posee la capacidad de detener el ciclo celular de células de mamíferos en la etapa G2/M. Esta acción sobre las células inmunes trae como consecuencia una inmunosupresión local. También puede inhibir la proliferación de las células epiteliales (queratinocitos) y la respuesta fibrótica ^(10, 18).

Numerosos estudios han deducido que las masas moleculares de las proteínas que son codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* corresponden a 24,5 KDa para CDTA, 31,4 KDa para B y 20,7 KDa para CDTC ^(19, 20, 21, 22, 47).

Existe controversia en términos de las funciones que posee cada una de las subunidades que conforman la toxina CDT de *A. actinomyetemcomitans*. La literatura describe que la subunidad CDTA presenta una secuencia consenso para lipoproteína, la cual puede estar asociada a la membrana plasmática de la bacteria. ^(10, 54). Por otra parte, se ha determinado que CDTB posee actividad DNAsa, que se activaría una vez que se encuentra dentro de la célula blanco. El daño generado en el DNA provoca una activación de los checkpoints del ciclo celular. De este modo

ocasiona la detención del ciclo celular en la etapa G2 y la posterior entrada en apoptosis de la célula dañada ^(22, 23, 55).

CDTA y CDTC, por otra parte, formarían un complejo estable que se uniría directamente a la superficie celular ^(18, 56, 57). No obstante, las investigaciones demuestran resultados controversiales. Algunas indican que bastaría la unión de CDTA y CDTB para producir la detención del ciclo celular ⁽⁵⁸⁾. Otras plantean que la formación de un heterodímero entre CDTC y CDTB podrían producir dicho efecto ^(10, 21). Sin embargo, no se puede desechar la posibilidad de que CDTC por sí solo conforme también una subunidad activa, como lo han propuesto algunos estudios ⁽⁵⁹⁾. Últimamente, se ha descrito que CDTC entra a la célula blanco, junto con CDTB ⁽⁵⁷⁾, lo cual sugiere que dicha subunidad podría tener otras funciones las que todavía no han sido dilucidadas.

Además de inhibir la progresión del ciclo celular, se descubrió recientemente que la toxina CDT de *Campylobacter jejuni* estimula directamente la liberación de interleuquina-8 (IL-8), desde las células del epitelio intestinal ^(60, 61). Esto sugiere la posibilidad de que la toxina producida por *A. actinomycetemcomitans* juegue un doble rol y que los diferentes componentes de esta toxina podrían jugar diferentes roles en la inducción o la inhibición de la respuesta inmune ⁽⁶⁰⁾.

Se ha descrito que la región genómica donde se encuentran los genes que codifican la toxina CDT es altamente polimórfica, existiendo

cepas de *A. actinomycetemcomitans* que no poseen el operon *cdt*. En diferentes poblaciones humanas, se han podido obtener aislados de este microorganismo que presentan los genes *cdt* en una frecuencia mayor o igual al 86% (24, 62, 63). Por otra parte, polimorfismo en las regiones aledañas al operon darían cuenta de la presencia de cepas que presentan diferencias en la producción de esta toxina (25).

No existen trabajos que describan genéticamente la presencia o el polimorfismo de los genes *cdt* de *A. actinomycetemcomitans* en poblaciones latinoamericanas. Actualmente, en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile se encuentran realizando un estudio comparativo de los genes que codifican los factores de virulencia de las cepas de esta bacteria en aislados clínicos de individuos chilenos y colombianos. Este trabajo de investigación analiza la presencia y el polimorfismo de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal.

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados nos hemos planteado la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS.

“Existen aislados clínicos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, provenientes desde pacientes colombianos con enfermedad periodontal, que presentan polimorfismo en la región del genoma que posee el operón *cdt*.”

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la existencia de polimorfismo en la región del genoma que contiene los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* en aislados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que provienen de pacientes colombianos con enfermedad periodontal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Aislar colonias de *A. actinomycetemcomitans* provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal.
- 2) Aislar el DNA de las colonias de *A. actinomycetemcomitans* provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal.
- 3) Confirmar, mediante PCR, que cada aislado corresponde a *A. actinomycetemcomitans* utilizando primers que amplifican un fragmento del gen del rRNA de 16S de este microorganismo.
- 4) Diseñar primers específicos que permitan amplificar los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, que codifican la toxina CDT de *A. actinomycetemcomitans*.
- 5) Determinar, mediante PCR, la presencia de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* en aislados de Aa., provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal.

- 6) Determinar, mediante análisis de restricción, la presencia de polimorfismo del operon *cdt* en aislados de Aa., provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal.

- 7) Determinar la frecuencia de aislados de Aa., provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal, que presentan los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*.

MATERIAL Y MÉTODO.

Pacientes:

Los pacientes fueron seleccionados y tratados en la Facultad de Odontología de la Universidad del Valle en Calí, Colombia. Se analizaron un total de 268 pacientes, entre hombres y mujeres, con diagnóstico de enfermedad periodontal crónica ó agresiva. Ninguno de los sujetos había recibido tratamiento periodontal previo, no presentaban enfermedades sistémicas y no habían recibido terapia con anti-inflamatorios o antibióticos durante los seis meses previos a la toma de la muestra.

Muestras de placa subgingival:

Las muestras de placa subgingival, en cada paciente, fueron colectadas desde cuatro sitios periodontales afectados, uno en cada cuadrante. Cada sitio escogido presentó una profundidad de saco igual o superior a 5mm y con pérdida de inserción de aproximadamente 3 mm. El área alrededor de la zona de muestreo fue aislada con algodón y secada suavemente con aire, los depósitos subgingivales fueron removidos cuidadosamente con curetas. Las muestras microbiológicas subgingivales, se obtuvieron insertando dos conos de papel estériles N° 30 dentro de la región más profunda del bolsillo periodontal, y mantenidos durante 20 segundos. Se realizó un pool juntando los conos de los 4 sitios (de cada

paciente) al colocarlos en un vial que contiene 2 ml de medio de transporte (RTF) ^(64, 71).

Procedimiento microbiológico:

Las muestras de placa subgingival se homogenizaron utilizando vortex por 45 segundos y luego diluidas, 10 y 100 veces (10^{-1} y 10^{-2}) y plaqueadas en medio Dentaid-1, selectivo para *A. actinomycetemcomitans*. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 a 96 horas en un sistema de jarra-candela ^(65, 66).

Las colonias fueron seleccionadas de acuerdo a su morfología y a la reacción de la catalasa, aquellos aislados que merecían dudas fueron confirmados utilizando PCR. Las colonias fueron purificadas, realizando trasposos sucesivos en placas Petri con medio Dentaid-1.

En la realización de este estudio se consideró solo una colonia de *A. actinomycetemcomitans* por paciente.

Extracción de DNA:

La extracción de DNA fue realizada de acuerdo a lo descrito por Ashimoto, *et al* 1996 ⁽⁶⁷⁾. Brevemente, utilizando conos de papel se toma una colonia desde el medio de cultivo, este cono es colocado en un tubo eppendorf que contiene buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM), se mezcló con vortex y se calentó durante 5 minutos a 100°C. Luego se enfrió por 5

minutos en hielo, se llevó a microcentrifuga por 5 minutos y finalmente se colectó el sobrenadante, donde se encontraba el DNA.

Reacción de la polimerasa en cadena (PCR):

Esta técnica se utilizó para confirmar algunos de los aislados de *A. actinomycetemcomitans* (primers A₁ y A₂) y amplificar los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Para la amplificación de los genes *cdt* se utilizaron los primers diseñados mediante el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), en base a la secuencia del operon *cdt* (número de acceso AF102554) obtenida a partir de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (ver figura 1). También fueron utilizados los primers EUB₁ y EUB₂ como controles de amplificación, estos primers amplifican el gen del rRNA de 16S de eubacterias. La totalidad de los primers utilizados se muestran en la tabla 1.

Amplificación de DNA:

La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25 μ l y estaba compuesta por, Buffer PCR 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 μ M de primers, 0,5 Unidades de *Taq* polimerasa, finalmente se le agregaron 10 μ l de DNA de cada aislado. Las reacciones se realizaron en tubos de 0,2 ml en un termociclador BioRad iCycler, los parámetros utilizados fueron: 30 ciclos

de: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos. Por último un ciclo de 72°C por 10 minutos.

Tabla 1.- Partidores utilizados en este trabajo de investigación.

Primer	Secuencia 5' - 3'	Gen	Tamaño (pb)
CdtA ₁	ATGAAGAAGTTTTTACCTGGTC	<i>cdtA</i>	669
CdtA ₂	TAATTAAGGGGTCAAGCTTCT		
CdtB ₁	TGCAATCCCATTTCGAATTA	<i>cdtB</i>	851
Cdt B ₂	TTAGCGATCACGAACAAAAC		
CdtC ₁	CTTTAGGTACATGTATTGAA	<i>cdtC</i>	560
CdtC ₂	GATGCTTAGTGGGGCGAGGG		
A ₁	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCT	Segmento del rDNA 16S de Aa	557
A ₂	ATGCCAACTTGACGTAAAT		
EUB ₁	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	rDNA16S de eubacterias	1510
EUB ₂	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA		

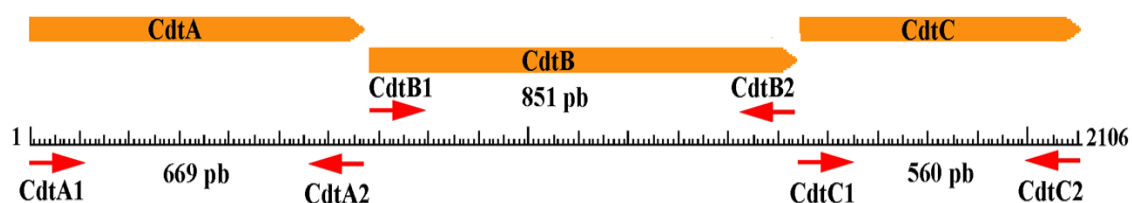


Figura 1.- Representación esquemática de la ubicación de los genes en el operón *cdtABC*. Se indica el tamaño de cada gen y la ubicación de los partidores utilizados (pb= pares de bases).

Digestión con endonucleasas de restricción:

Las digestiones enzimáticas se realizaron utilizando el método descrito por Sambrook y Russell, 2001 ⁽⁶⁸⁾. Las endonucleasas de restricción utilizadas fueron las siguientes: *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *PvuI*, *BglI*, *NcoI*, *Clal*, *HaeIII*, *EcoRV*, *TaqI*, *SmaI*, *KpnI*, *SfiI*, *NdeI* y *HindIII*.

Análisis de los productos de PCR y de digestión:

El análisis de los productos de PCR y de digestión se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X (TRIS, Ácido acético, EDTA) y bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Brevemente, 5 µl de la reacción de PCR fue mezclado con 1 µl de buffer de carga GLD. El tamaño de los fragmentos de DNA fue comparado con el estándar de peso molecular 100 bp de Invitrogen, Lifetechnology y lambda/*HindIII* de New England BioLabs.

RESULTADOS.

A partir del total de pacientes analizados en este estudio se seleccionaron 80 en que fue posible aislar, mediante cultivo, *A. actinomycetemcomitans*. Ocho pacientes presentaban periodontitis agresiva, con un rango de edad entre 15 y 32 años. Los 72 pacientes restantes fueron diagnosticados con periodontitis crónica y su rango de edad fluctuaba entre los 37 y 55 años.

Una colonia de cada paciente fue tomada del medio de cultivo con conos de papel y se realizó la extracción de DNA, como es descrito en material y métodos. Fue necesario confirmar siete aislados mediante PCR utilizando los primers A₁ y A₂, ya que presentaban diferencias en la morfología colonial típica de *A. actinomycetemcomitans*. Los siete fueron confirmados positivamente al amplificar el fragmento de 557 pares de bases (bp). Un ejemplo con cuatro de los clones se ve en la figura 2.

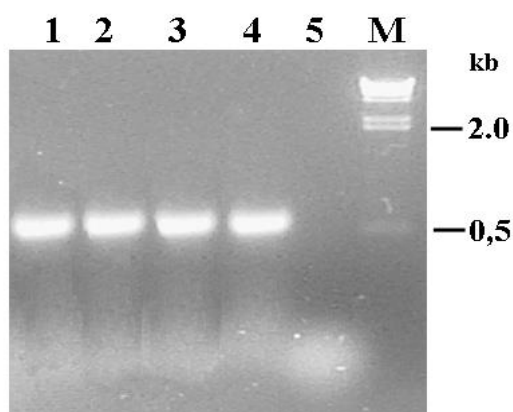


Figura 2.- Electroforesis donde se muestra la confirmación, utilizando los primers A₁ y A₂ de cuatro aislados. En el carril M se encuentra el marcador de tamaño molecular (DNA del fago lambda digerido con *HindIII*). Carril 1-4, amplificación obtenidas utilizando los primers específicos para *A. actinomycetemcomitans* (A₁ y A₂). Carril 5, control negativo, se han utilizado los primers específicos A₁ y A₂ con DNA de *E. coli*.

Posteriormente, se realizó la amplificación con los primers CdtA₁ y CdtB₂ (ver figura1). En la figura 3A y 3B se muestra el análisis de 38 de las muestras de este estudio. Se puede observar que solo algunas, amplifican la banda de 1535 bp que contiene los genes *cdtA* y *cdtB*. Del total de 80 aislados solo 63 amplificaron dicha banda.

En los 17 clones en los cuales no se obtuvo amplificación con los primers CdtA₁ y CdtB₂ se realizó la amplificación de cada uno de los genes *cdt* por separados, todos dieron nuevamente negativo (datos no mostrados).

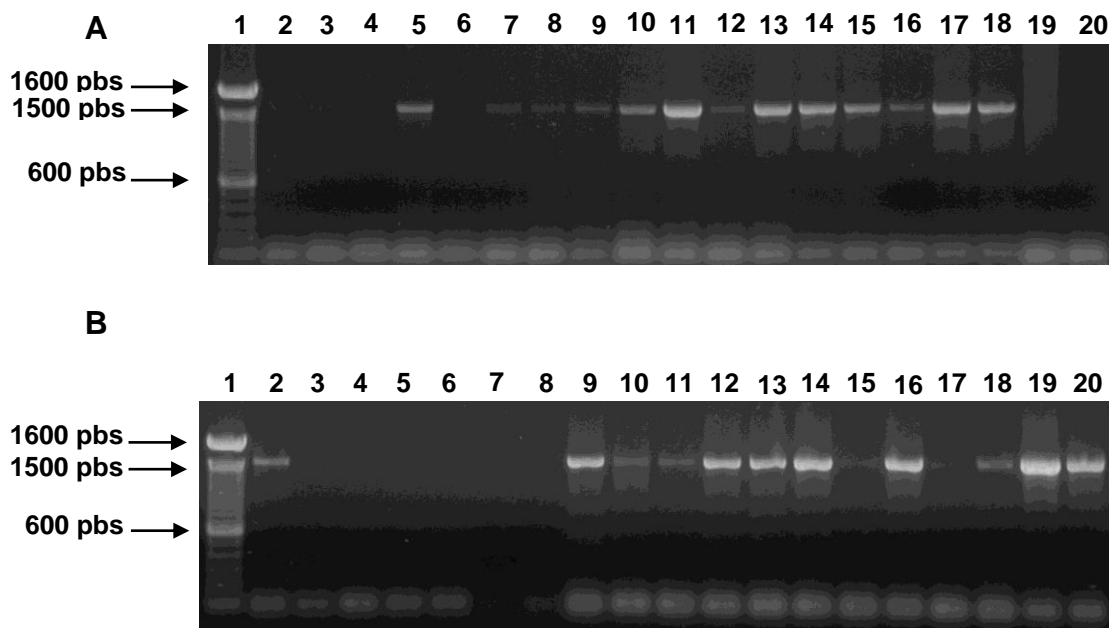


Figura 3.- Electroforesis en gel de agarosa. En A y B se muestra la amplificación de 38 muestras, donde se utilizan los primers CdtA₁ y CdtB₂. Carriles 1 en ambos gels corresponden al marcador de tamaño molecular (100bp Invitrogen Corporation).

Para comprobar que los clones que amplificaban los genes *cdtA* y *cdtB* también presentaban el gen *cdtC* se procedió a amplificar el fragmento de 2106 bp que contiene los tres genes, para ello se utilizaron los primers CdtA₁ y CdtC₂ (ver figura1). En la figura 4 se muestra el análisis de 19 de estos clones y en todos se logra amplificar este fragmento.

De esta manera, de un total de 80 aislados analizados, 63 amplifican el fragmento correspondiente al operón *cdt* (fragmento de 2106bp). Esto nos permitiría estimar que la frecuencia relativa de clones que amplifica el fragmento del operon *cdt* que llevaría los tres genes (*cdtA*, *cdtB* y *cdtC*) es 0,78, lo que en términos porcentuales corresponde al 78%. Esto además, nos indica que existirían diferencias en el genoma de los aislados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*, utilizados en este estudio. Esto definiría la existencia de polimorfismo por delección y por lo tanto cepas distintas de este microorganismo entre los pacientes colombianos con enfermedad periodontal.

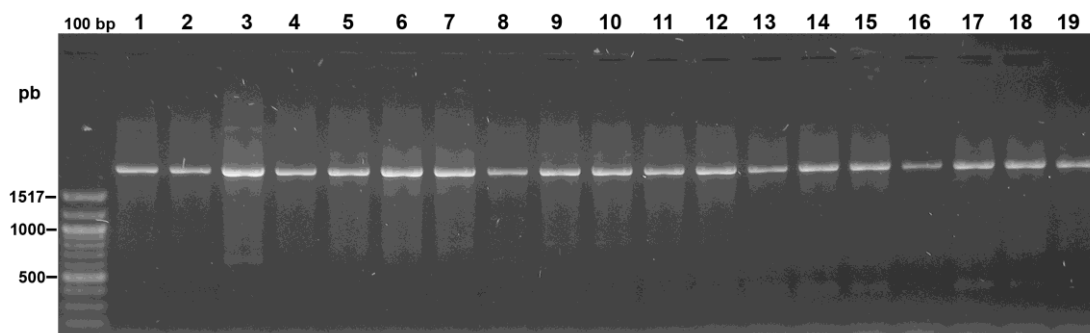


Figura 4.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X. Se amplifican un fragmento de 2106 bp que contiene los tres genes *cdt*. Aquí se utilizaron los primers Cdt A₁ y Cdt C₂. Se escogieron 19 clones que amplificaron previamente los genes *cdtA* y *cdtB*, en el fragmento de 1535bp.

Una segunda etapa de este trabajo consistió en determinar si existe polimorfismo de restricción en los fragmentos de 1535 y 2106 pb obtenidos a partir de los 63 aislados. Un ejemplo de estos análisis se puede observar en las figuras 5 y 6. En la figura 5 se presenta una electroforesis en gel de agarosa donde se analiza el patrón de restricción al utilizar la enzima *PstI* sobre el fragmento de 1535 bp. se puede distinguir que no existen sitios para esta enzima en este fragmento. Esto es concordante con lo esperado de acuerdo al análisis de restricción, realizado con el software webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>), de la secuencia con número de acceso AF102554, que posee el operón *cdt*, y se encuentra en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Una situación similar a lo acontecido con *PstI*, es la que ocurre cuando se utilizan las enzimas *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *BglII*, *PvuII*, *Clal*, *EcoRV*, *SmaI*, *KpnI*, *SfiI*, *NdeI* y *NcoI* (datos no mostrados).

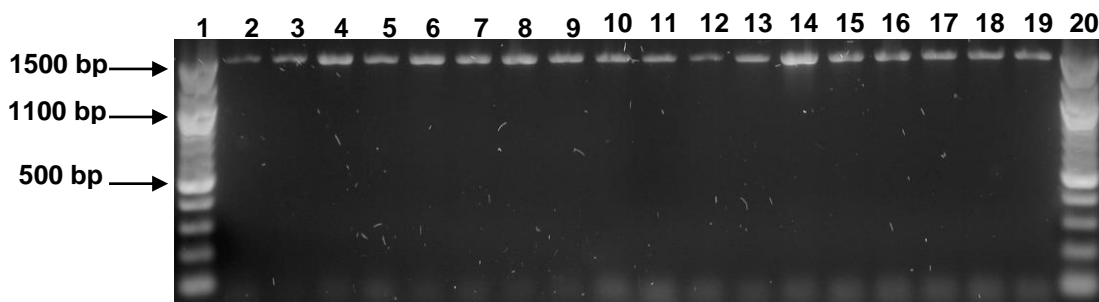


Figura 5.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X. Se muestra la digestión, con la enzima *PstI*, del fragmento de 1535 bp (genes *cdtA* y *cdtB*) de 17 de las 63 muestras analizadas. Carriles 1 y 20 marcador de tamaño molecular 100 bp.

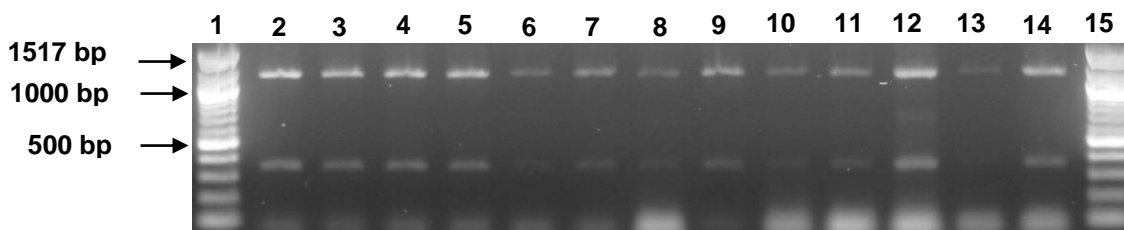


Figura 6.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X. Se observa la digestión, con la enzima *HaeIII*, del fragmento de 1535 bp (genes *cdtA* y *cdtB*) de 13 de las muestras analizadas. Los fragmentos producidos poseen los tamaños 1170 bp y 365 bp. Carriles 1 y 15 marcador de tamaño molecular 100 bp.

En la figura 6 se presenta el resultado de la digestión del fragmento de 1535 pb con la enzima *HaeIII*, esta enzima posee un sitio de restricción en este amplicón por lo que se generan dos fragmentos, uno de 1170 bp y otro de 365 bp.

Así como se observa en las figuras 5 y 6 no fue posible encontrar polimorfismo entre los aislados analizados con ninguna de las enzimas.

Cuando se trabajó con la enzima *HindIII*, esta permitió encontrar diferencias en el patrón de digestión en 3 de los 63 clones que amplificaron el fragmento *cdt*. Tal como se esperaba, en relación al análisis de restricción de la secuencia de la base de datos, la mayoría de los clones (60 clones) presentan dos sitios de restricción en ambos amplicones (el de 1535 pb y el 2106pb). En el caso del fragmento de 1535 pb se obtienen tres bandas de 413 bp, 463 bp y 659 bp (figura 7A). Los tres clones que presentaron

diferencias en el patrón de restricción no eran digeridos por esta enzima. En la figura 7B se muestra el fragmento *cdtABC* que posee 2106 pb de 10 clones, tres de ellos no fueron digeridos por la enzima (carriles 4, 5 y 6). En los clones restantes se observan las bandas de 413 bp, 659 bp y 1034 bp.

En 7B se ha digerido el fragmento *cdtABC* de 2106 bp, que posee los tres genes que pertenecen a este operon, en este caso, similar a lo que ocurre en 7A, se conservan las bandas de 413 y 659 bp, lo que implica que los sitios de restricción se encuentran en los genes *cdtA* y *cdtB*.

De las enzimas que fueron utilizadas en este trabajo, las únicas que digirieron el fragmento *cdtABC* fueron *HaeIII*, *HindIII* y *TaqI*, como se mencionó anteriormente, *HindIII* fue la única que presentó polimorfismo. En la figura 8 se representa un mapa de restricción para el fragmento de 2106 bp, el cual muestra los sitios de corte. Por otra parte, en la tabla 2 se presenta un resumen de los resultados en términos de los clones polimórficos detectados en este trabajo.

Tabla 2.- Cuadro resumen donde se señala el número de clones y el tipo de polimorfismo encontrado en este trabajo.

Enfermedad	Clones analizados	Clones que amplifican <i>cdtABC</i>	Clones polimórficos con <i>HindIII</i>
Periodontitis agresiva	8	8	0
Periodontitis crónica	72	55	3
Total	80	63	3

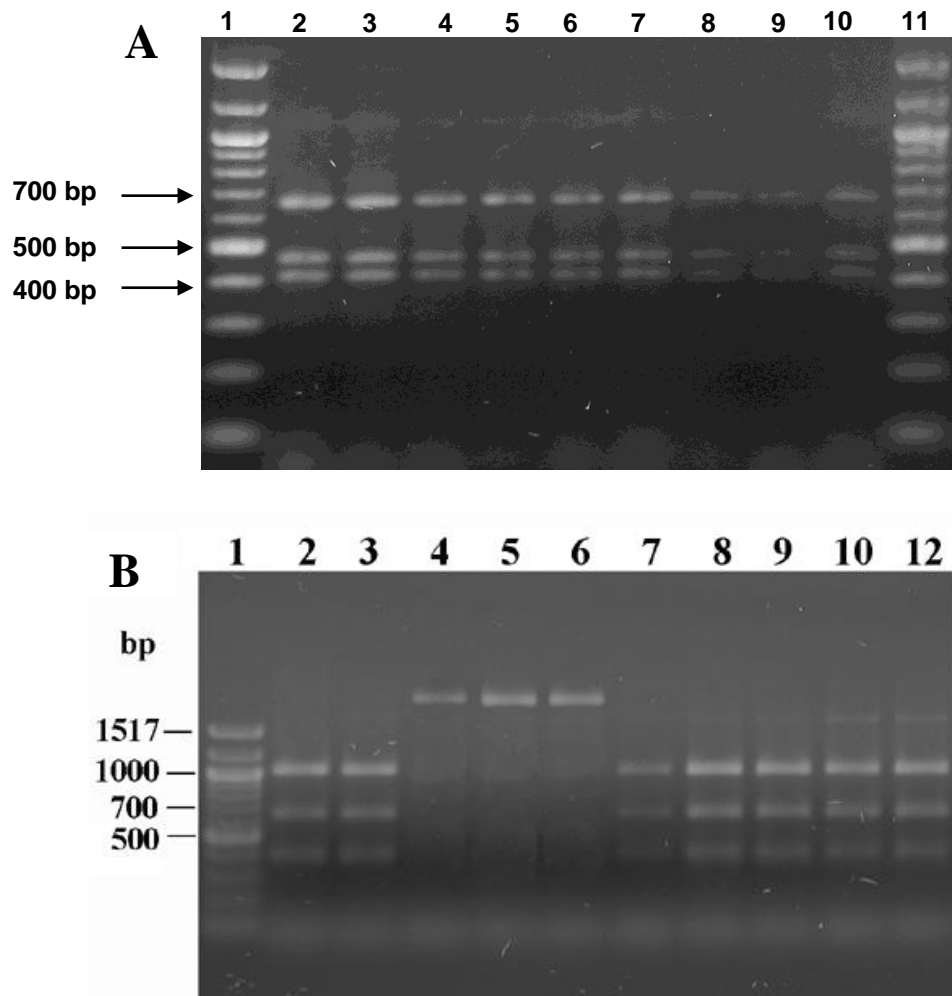


Figura 7.- Digestión de los genes *cdt*, con la enzima *HindIII*. En A se muestran 9 clones a los cuales se ha digerido el fragmento de 1535 bp. En B el fragmento *cdtABC* (2106bp) de 10 clones fue sometido a digestión con *HindIII*. En A los carriles 1 y 11 corresponden al estándar de tamaño molecular (100bp). En B el carril 1 es el marcador de tamaño molecular, 100 bp.

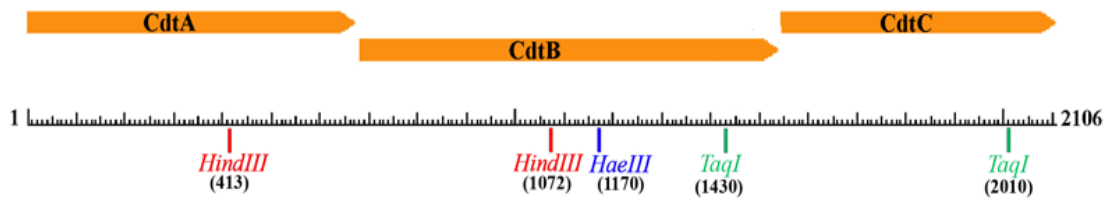


Figura 8.- Mapa de restricción del fragmento *cdtABC* (2106 bp) donde se señalan los sitios de corte de las enzimas *HaeIII*, *HindIII* y *TaqI*.

DISCUSIÓN.

La periodontitis pertenece a un grupo complejo de enfermedades que son de naturaleza infecciosa. Este tipo de patologías figuran entre las afecciones más comunes del género humano, presentando una alta prevalencia en la población adulta ⁽⁶⁹⁾.

Se han descrito un conjunto de bacterias patógenas, las cuales serían capaces de generar la respuesta en el hospedero que lleva a la destrucción de las estructuras de soporte e inserción del diente, incluyendo encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (enfermedad periodontal) ^(4, 5, 27).

Entre estos microorganismos se encuentra *A. actinomycetemcomitans*. Actualmente, no se conocen los mecanismos específicos mediante los cuales este microorganismo participa en la patogenia de la enfermedad periodontal. No obstante, se sabe que posee un número importante de factores de virulencia entre los que se encuentra una toxina, descrita recientemente, llamada cytolethal distending toxin (CDT) ⁽¹⁸⁾.

El análisis de la bibliografía, referente a la toxina CDT, describe que estos genes no siempre están presentes en los diferentes aislados clínicos de este microorganismo. En poblaciones humanas europeas y asiáticas se ha establecido que la prevalencia de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* presenta valores superiores o iguales al 86% y 89% ^(24, 25, 63). A la fecha, no se

describen estudios tendientes a la caracterización de esta toxina, los genes que la codifican y tampoco los mecanismos que regulan la expresión de estos genes, en aislados de pacientes latinoamericanos. En este trabajo de investigación ha sido posible determinar que la prevalencia de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, en 80 aislados de *A. actinomycetemcomitans*, provenientes de igual número de pacientes con enfermedad periodontal colombianos, corresponde a un 78%. Además, se puede desprender que, aparentemente la delección comprendería a los tres genes. Un trabajo similar que se encuentra realizando en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile con aislados de pacientes chilenos ha dado como resultado una prevalencia de un 64,6% con 35 aislados analizados (comunicación personal). Estos resultados llevaría a pensar que la región del genoma de *A. actinomycetemcomitans*, que lleva los genes del operón *cdt*, es altamente polimórfica ya que existiría un conjunto de cepas que no presenta estas secuencias.

Un análisis de RFLPs a partir del DNA genómico proveniente de aislados clínicos de pacientes japoneses, permitió observar polimorfismo genético en las regiones río arriba y río abajo del locus *cdt*. En este caso se utilizó como enzima de restricción la enzima *HindIII* y como sonda dos fragmentos, uno río arriba ubicado aproximadamente a 350 bp del fragmento *cdtABC* y otro que correspondió a todo el segmento *cdtABC* ⁽²⁵⁾. En nuestro estudio, se realizó un análisis de restricción a partir de los fragmentos de

PCR que contenían los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Con la mayoría de las enzimas utilizadas, no fue posible encontrar cepas que presentaran diferencias en el patrón de restricción de estos genes. Sin embargo, al utilizar la enzima *HindIII* fue posible observar polimorfismo, en tres aislados que no presentaban sitios de restricción para esta enzima (figura 7B). Del total de clones que amplificaron el fragmento *cdtABC* (N= 63) el 95,2 % presentaron un patrón de restricción de acuerdo a lo esperado por el análisis de la secuencia AF102554. Ellos presentaban sitios para *HindIII* en el nucleótido 413 (en el gen *cdtA*) y otro en el nucleótido 1072 (en el gen *cdtB*). Sin embargo, tres no poseerían ninguno de estos sitios, demostrando que existe polimorfismo para estos genes en las cepas colombianas de *A. actinomycetemcomitans* estudiadas. Un aspecto significativo es que estos clones habrían perdido los dos sitios para *HindIII*, lo cual señala que habría cambios en las secuencias de los genes *cdtA* y *cdtB*, lo que podría estar relacionado con la actividad de la toxina producida por estos aislados. Un aspecto a considerar es que un análisis semejante, realizado en cepas chilenas de *A. actinomycetemcomitans* nos muestra, hasta ahora, que no existe polimorfismo, y que el 100% de los clones analizados presenta un patrón de restricción, con la enzima *HindIII*, semejante a los tres clones polimórficos encontrados en la muestra colombiana (Comunicación personal).

Estos resultados nos llevan a plantearnos la realización de estudios complementarios que confirmen que efectivamente los clones que no amplifican los genes *cdt* no presentan estos genes en su genoma. Una alternativa sería la realización de Southern blot utilizando sondas específicas para cada uno de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Además, sería importante analizar las regiones río arriba y río abajo del operón *cdt* para determinar si estas regiones presentan polimorfismo y si poseen un rol relevante en la producción de la toxina. Por otra parte, también sería interesante el determinar la actividad de la toxina CDT en los aislados que presentan polimorfismo, con el objetivo de observar si esto conlleva a la producción de una toxina más activa.

Otro aspecto que podría ser estudiado es la asociación de las cepas que producen esta toxina y el tipo de enfermedad periodontal. Algunos autores han observado que los pacientes que presentan enfermedad periodontal agresiva, en general, presentan cepas de *A. actinomycetemcomitans* que poseen el operón *cdt* y producen la toxina ⁽⁷²⁾. Esto podría llevar hacia la confirmación, de que este factor de virulencia estaría relacionado con el tipo de enfermedad periodontal, a semejanza a lo que ocurre con la leucotoxina ^(73, 74).

En poblaciones Latinoamericanas no se han realizado investigaciones respecto a la caracterización de los diferentes factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans*, este es uno de los primeros aportes a este

respecto, lo cual permitiría ayudar a la resolución de tratamientos de tipo preventivo en aquellos pacientes que presentes cepas más virulentas, aunque podría ajustarse, fundamentalmente, a aquellos pacientes jóvenes que poseen el microorganismo pero que aún no desarrollan destrucción tisular.

CONCLUSIONES.

- 1- Existen aislados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, en pacientes colombianos, con enfermedad periodontal, que no poseen los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*.
- 2- La prevalencia de los genes que codifican la toxina CDT de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, en la muestra estudiada de pacientes colombianos con enfermedad periodontal, corresponde a un 78%.
- 3- Existe polimorfismo en la región de los genes *cdtA* y *cdtB*, al utilizar la enzima *HindIII*, entre los aislados colombianos analizados.
- 4.- Al encontrar 3 clones que no presentan los sitios de restricción con la enzima *HindIII* podemos concluir que hay diferencias en la secuencia de los genes, de estos clones, respecto a la secuencia del operón *cdt* que se encuentra en la base de datos del NCBI.

RESUMEN.

A. actinomycetemcomitans es una bacteria Gram negativa que es considerada como uno de los patógenos importantes en la enfermedad periodontal (8, 9, 10). Sin embargo, este microorganismo también ha sido asociado a una variedad de enfermedades sistémicas humanas como endocarditis, meningitis y osteomielitis (10).

Se ha descrito que este microorganismo posee numerosos factores de virulencia que le permitirían invadir el tejido conectivo gingival (9, 10). Entre ellos se encuentra una toxina llamada cytolethal distending toxin (CDT), la que es capaz de producir inmunosupresión local e inhibición de queratinocitos y fibroblastos, gracias a su inhibición de la progresión del ciclo celular, induciendo a la entrada en apoptosis de estas células (18, 22).

Esta holotoxina es una molécula compuesta por tres subunidades CDTA, CDTB y CDTC (10) las cuales están codificadas por tres genes que conforman un operón y que son llamados de la misma forma que los polipéptidos que codifican (10).

En el presente trabajo se describe que a partir de 80 aislados de *A. actinomycetemcomitans*, provenientes de pacientes colombianos con enfermedad periodontal, existen algunos de ellos en los que no hubo amplificación de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* por PCR, que codifican la toxina CDT. Determinando una prevalencia del 78% en la muestra estudiada.

Además, se pudo determinar que tres de los 63 clones que amplifican el operon *cdt*, presentan diferencias en el patrón de restricción, en este fragmento, cuando se utiliza la enzima de restricción *HindIII*.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Offenbacher S. 1996. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1: 821- 878.
2. Paster B.J, S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N Lau, V.A. Levanos, A Sahasrabudhe, F.E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183: 3770- 3783.
3. Socransky, S.S. 1977. Microbiology of Periodontal Disease Present Status and Future Considerations. *J. Periodontol* 48 : 497-504.
4. Ellison S.A. 1970. Oral Bacteria in Periodontal Disease. *J. Dent. Res.* 59: 198-202.
5. Clark, W.B. and Løe, H. 1993. Mechanism of Irritation and Progresion of Periodontal Disease. *Periodontology* 2000. 2: 72-82.
6. Schluger, S., Youdelis, R., Page, R. and Johnson, R. 1990. Periodontal Diseases: Basic Phenomena, Clinical Management, and Oclussal and Restorative Interrelationship. Lea & febier, USA. Cap. 2, 3, 4, 7, 8.
7. Asikainen, S., Lai, C.H., Alaluusua, S. and Slots, J. 1991. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol. Inmunol.* 6: 115-118.
8. Ebersole, J.L., Cappelli, D. and Sandoval, M.N. 1994. Subgingival distribution of *A. actinomycetemcomitans* in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 21: 65-75.

9. Meyer, D.H. and Fives-Taylor, P. 1997. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. Trends Microbiol 5: 224-228
10. Brian Henderson, Sean P. Nair, John M. Ward, and Michael Wilson. Molecular Pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annu. Rev. Microbiol. 2003. 57:29–55.
11. Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. 2000. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationship between serotype, genotype and antimicrobial susceptibility. J. Clin. Microbiol. 38:998–1007.
12. Page RC, Sims TJ, Engel LD, Moncia BJ, Bainbridge B, et al. 1991. The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. Infect. Immun. 59:3451–62.
13. Robertson P., Lantz P., Marucha K., Kornman C., Trummel C. and Holt S. 1982. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res. 3: 275-283.
14. Fine D., Furgang D., Schreiner H., Goncharoff P., Charlesworth J., Ghazwan G., Fitzgerald-Bocarsly P. and Figurski D. 1999. Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. Microbiol. 145 :1335-1347.

15. Saglie F., Simon J., Merrill J. and Koeffler. 1990. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein. *Oral Microbiol. Immunol.* 5: 256-262.
16. Rally E., Kieba I., Golub J., Lear D. and Tanaka C. 1996. Structure/function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *J. Periodontol.* 67: 298-308.
17. Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M, Kieba I, Lally ET. 2000. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induced apoptosis. *Microb. Pathog.* 29: 267–78.
18. Heywood W, Henderson B, Nair S.P. 2005. Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J. Med. Microbiol* 54: 207-216.
19. Shenker B., Vitale L., and King C. 1995. Induction of human T cells that coexpress CD4 and CD8 by immunomodulatory protein produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cell Immunol.* 164: 36-46.
20. Sato T, Koseki T, Yamato K, Saiki K, Konishi K, et al. 2002. P53-independent expression of p21^{CIP 1/W AF 1} in plasmacytic cells during G2 cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 70:528–34.

21. Shenker BJ, Hoffmaster RH, McKay TL, Demuth DR. 2000. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. *J. Immunol.* 165:2612–18.
22. Shenker BJ, Hoffmaster RH, Zekavat A, Yamaguchi N, Lally ET, Demuth DR. 2001. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J. Immunol.* 167:435–41.
23. Shenker BJ, McKay T, Datar S, Miller M, Chowhan R, Demuth D. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. *J. Immunol.* 162:4773–80.
24. Ahmed H.J, Svensson L.A, Cope L.D, Latimer J.L, Hansen E.J, Ahlman K, Bayat-Turk J, Klamer D. and Lagergard T. 2001. Prevalence of *cdtABC* genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomytemcomitans* strains. *J Med Microbiol.* 50: 860-864.
25. Yamano R, Ohara M, Nishikubo S, Fujiwara T, Kawamoto T, Ueno Y, Komatsuzawa H, Okuda K, Kurihara H, Suginaka H, Oswald E, Tanne K, Sugai M. 2003. Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1391-1398.

26. Mariotti A. 1999. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann periodontol*; 4: 7-17.
27. Carranza, F., Newman, M. *Periodontología Clínica*. Editorial Interamericana (1998) Mexico. Capítulo 6.
28. Armitage G. 1999 Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann periodontol*; 4: 1-6.
29. Flemming T.F. 1999. Periodontitis. *Ann periodontol*; 4: 32-37.
30. Armitage G. 2000. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, Vol 34, 2004, 9-21.
31. Consensus Report: Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis. 1999 *Ann. Periodontol* 4 : 38 y 4: 53.
32. Academy Reports. 1999. The pathogenesis of periodontal diseases. *Periodontol* 1999; 70: 457-470.
33. Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. 1993. Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 8:361–69.
34. Inouye T, Ohta H, Koikeguchi S, Fukui K, Kato K. 1990. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57:13–17.

35. Inouye T, Tanimoto I, Ohta H, Kato K, Murayama Y, Fukui K. 1998. Molecular characterization of low-molecular-weight component protein, Flp, in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Microbiol. Immunol.* 42:253–58.
36. Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten MA, Nelson GM. 1988. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol. Immunol.* 3:58–63.
37. Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. 1991. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J. Periodontol.* 62:203–6.
38. Muller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T, Zoller L. 2001. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 36:114–23.
39. Nakano Y, Yoshida Y, Suzuki N, Yamashita Y, Koga T. 2000. A gene cluster for the synthesis of serotype d-specific polysaccharide antigen in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1493:259–63.
40. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Nakao H, Yamashita Y, Koga T. 2000. Genetic analysis of the gene cluster for the synthesis of serotype a-specific polysaccharide antigen in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1517:135–38.

41. Kaplan J.B, Perry M.B, MacLean L.L, Furgang D, Wilson M.E, Fine D.H. 2001. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect. Immun* 69: 5375-5384.
42. Najjar FZ. 2002. Sequence and analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. PhD thesis. Univ. Oklahoma. 272 pp.
43. Asikainen, S., Chen, C., and Slots, J. 1995. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral. Microbiol. Immunol.* 10: 65-68.
44. Saarela M, Dogan B, Alaluusua S, Asikainen S. 1999. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). *J. Periodontol.* 70:504–9.
45. Henderson B, Oyston PC. 2003. *Bacterial Evasion of Host Immune Responses*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
46. Wilson M, ed. 2002. *Bacterial Adhesion to Host Tissues: Mechanisms and Consequences*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
47. Narayan SM, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. 2002. Leukotoxins of Gram-negative bacteria. *Vet. Microbiol.* 84:337–56.
48. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7:356–61.

49. Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, et al. 1997. RTX toxins recognize a $\beta 2$ integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.* 272:30463–69.
50. Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hanstrom L, Kalfas S. 2002. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.* 37:353–59.
51. Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Sandstrom G, Kalfas S. 2000. Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.* 35:85–92.
52. Johansson A, Sandstrom G, Claesson R, Hanstrom L, Kalfas S. 2000. Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to bacterial leukotoxicity. *Eur. J. Oral Sci.* 108:136–46.
53. Taichman NS, Iwase M, Lally ET, Shattil SJ, Cunningham ME, Korchak HM. 1991. Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant cells. *J. Immunol.* 147:3587–94.
54. Mao X, DiRienzo JM. 2002. Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cell Microbiol.* 4:245–55.

55. Sugai M, Kawamoto T, Pérès S.Y, Ueno Y, Komatsuzuwa H, Fujiwara T, Kuriharo H, Suginaka H, Oswald E. 1998. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun* 66: 5008-5019.
56. Shenker B. J, Besack D, McKay T, Pankoski L, Zekavat A, Demuth D.R. 2005. Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity. *J. Immunol* 174: 2228-2234.
57. Akifusa S, Heywood W, Nair S.P, Stenbeck G, Henderson B. 2005. Mechanism of internalization of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol* 151: 1395-1402.
58. Saiki K, Konishi K, Gomi T, Nishihara T, Yoshikawa M. Recostitution and purification of Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. 2001. *Microbiol. Immunol.* 45: 497-506.
59. Deng K, Hansen E.J. 2003. A CdtA-CdtC complex can block killing of HeLa cells by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* 71: 6633- 6640.
60. Akifusa S, Poole S, Lewthwaite J, Henderson B, Nair SP. 2001. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate humanleukocyte cytokine synthesis. *Infect. Immun.* 69:5925–30.

61. Hickey T. E., A. L. McVeigh, D.A. Scott, R.E Michielutti, A. Bixby, S.A. Carroll, A. L. Bourgeois, and P. Guerry. 2000 *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 68: 6535-6541.
62. Tan K.S, Song K.P, Ong G. 2002. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* occurrence and association with periodontal disease. *J. Periodontol Res.* 37: 268- 272.
63. Fabris A.S, DiRienzo J.M, Wikstrom M, Mayer M.P.A. 2002. Detection of cytolethal distending toxin activity and cdt genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol. Immunol.* 17: 231- 238.
64. Syed, S.A. and Loesche, W.J. 1972 Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology.* 24: 638-644.
65. Slots J. et al. 1982 Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin Microbiol* 15: 606-609.
66. Alsina, M., Olle, E., & Frias, J. 2001 Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 39, 509-513.
67. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J., 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*; 11: 266-73.

68. Sambrook J and Russell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Ed.
69. Gamonal J.A, López N.J, Aranda W. 1998. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 years old population in Santiago, Chile. Int. Dent. J. 48: 96- 103.
70. Parra, B and Slots, J. 1996. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. Oral Microbiol. Immunol. 11:289-93
71. Lindhe, J. 2003. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4^o edición, Oxford, Blackwell,. 216-42.
72. Leung W, Ngai V, Yau J, Cheung B, Tsang P and Corbet E. 2005. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis. J. Periodontal Res. 40: 258-68.
73. Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dahlen G and Kilian M. 1996. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. J Clin Microbiol. 34:1576-1578.
74. Stabholz A, Taichman NS and Soskolne W. 1995. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and anti-leukotoxin antibodies in some members of an extended family affected by Papillon-Lefevre syndrome. J Periodontol. 66:653-657.

- f) Dentaid -1 (en un litro): 52gr Brain Heart Infusion agar
5 gr Yeast extract
1,5 gr Fumarato de sodio
1,0 gr Formato de sodio
9,0 ug/ml vancomicina
- g) Digestión enzimática: 729 ul agua Nanopure
105 ul Buffer enzima
5 ul enzima

APÉNDICE Nº 2 (ABREVIATURAS).

- a) TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano
- b) EDTA: Acido etilendiaminotetracético
- c) TE: TRIS-EDTA
- c) TAE: TRIS –Acido acético-EDTA
- d) DE: Medio cultivo Dentaid-1
- e) RTF: Solución de transporte