

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en enfermedad periodontal, identificación mediante la técnica de PCR**

Aggregatibacter actinomycetemcomitans in periodontal disease, identification through the PCR technique

Paola Patricia Orellana Bravo ^{1a}, Carlos Fernando Andrade Tacuri ^{1a}, Stalin Mauricio Masabanda Ibarra ^{1b}, María del Cisne Centeno Dávila ^{1c}, Javier Marcelo Tenemaza Tiban ^{1d}, John Xavier Mogrovejo Suarez ^{1d}, Carlos Joaquin Montenegro Delgado ^{1d}, Nathaly Fernanda Ledesma Villacis ^{1d}

¹ Facultad de Odontología, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

^a Doctor en Ciencias de la Salud.

^b Técnico del laboratorio de Biotecnología.

^c Especialista en Periodoncia e Implantología Quirúrgica.

^d Estudiante de la carrera de Odontología.

RESUMEN

Objetivos: La finalidad del presente artículo fue investigar sobre el patógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) e identificarlo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Materiales y métodos:** Se utilizó la técnica de lisis alcalina para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN), mediante PCR e iniciadores específicos se amplificó un segmento del gen ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S de *A. actinomycetemcomitans*. La especificidad de los iniciadores se ensayó utilizando material genético extraído de la cepa de referencia *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, frente a otras cepas. **Resultados:** Se investigó a detalle este patógeno y se identificó mediante primers específicos a *A. actinomycetemcomitans*. **Conclusiones:** Mediante PCR convencional se obtuvo una técnica sensible y específica para la detección de *A. actinomycetemcomitans*.

Palabras clave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Enfermedades periodontales; Reacción en Cadena de la Polimerasa (Fuente: DeCS).

ABSTRACT

Objectives: The aim of this article was to investigate the pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) and identify it by polymerase chain reaction (PCR). **Materials and methods:** The alkaline lysis technique was used for DNA extraction, and a segment of the 16S rRNA gene of *A. actinomycetemcomitans* was amplified by PCR and specific primers. The specificity of the primers was tested using genetic material extracted from the reference strain *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, against other strains. **Results:** This pathogen was investigated in detail and *A. actinomycetemcomitans* was identified by means of specific primers. **Conclusions:** A sensitive and specific technique for the detection of *A. actinomycetemcomitans* was obtained by conventional PCR.

Keywords: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Periodontal Diseases; Polymerase Chain Reaction (Source: MeSH).

Recibido: 26 de abril de 2024

Aprobado: 15 de octubre de 2024

Publicado: 31 de octubre de 2024

Correspondencia:

Paola Patricia Orellana Bravo

Correo electrónico: porellana@ucacue.edu.ec

© Los autores. Este artículo es publicado por la Universidad de San Martín de Porres (Lima, Perú) Es un artículo de acceso abierto distribuido bajo la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>



Citar como: Orellana Bravo PP, Andrade Tacuri CF, Masabanda Ibarra SM, Centeno Dávila MC, Tenemaza Tiban JM, Mogrovejo Suarez JX, Montenegro Delgado CJ, Ledesma Villacis NF. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en enfermedad periodontal, identificación mediante la técnica de PCR. KIRU.2024 oct-dic;21(4): 205-210. <https://doi.org/10.24265/kiru.2024.v21n4.03>

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una patología inflamatoria crónica y multifactorial, resultado de la acumulación de placa dental en los tejidos alrededor de los dientes formando bolsas que conducen a la reabsorción ósea, dando como consecuencia el aflojamiento y posterior pérdida de los dientes, afectando a la masticación y la estética. Los principales patógenos de la enfermedad periodontal son las bacterias anaerobias, entre las cuales figuran:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Eikenella*, *Capnocytophaga*, *Prevotella*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) esta última posee una serie de características las cuales la convierten en uno de los patógenos con gran importancia en la enfermedad periodontal, además de poder involucrarse en la generación de otras patologías como el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ^(1,2,3).

La enfermedad periodontal es una afección grave, de complejo desarrollo, bastante común a nivel mundial y conlleva procesos inflamatorios en la inserción alveolar de los dientes. Se ha confirmado que el biofilm subgingival desempeña un rol importante junto a las respuestas defensivas del periodonto en los procesos inflamatorios. Los pacientes con esta enfermedad presentan signos que se logran visualizar a nivel macroscópico como: inflamación de las encías, daño al tejido blando, formación de bolsas periodontales, además, esta infección puede llegar a destruir al hueso alveolar si no se trata apropiadamente, lo que puede generar una pérdida progresiva de soporte en los dientes provocando su caída ^(3,4). Esta enfermedad es multifactorial, asociada al hábito de fumar, cambios hormonales (en mujeres embarazadas-gingivitis de embarazo), mala higiene bucal, uso de drogas, obesidad, entre otros. Esto contribuye a la acumulación de distintas especies de microorganismos, provocando el desarrollo de patógenos como *A. actinomycetemcomitans*, una bacteria que tiene la capacidad de agravar la enfermedad periodontal ^(4,5).

A. actinomycetemcomitans es un cocobacilo anaerobio facultativo, que se desarrolla mejor bajo condiciones de anaerobiosis, es una bacteria Gram-negativa, no móvil, en su pared celular presenta endotoxinas o también llamados lipopolisacáridos propios de esta bacteria. Adicionalmente su polisacárido permite identificar serotipos desde "a" hasta "g",

en los cuales varía su acción de virulencia especialmente por la acción de la leucotoxina. Cabe recalcar el serotipo "b" es considerado el más leucotóxico, por esta razón está relacionado a la periodontitis de rápida destrucción ⁽³⁾.

A. actinomycetemcomitans es un microorganismo el cual fue aislado por Klinger en 1912, lo nombró *Bacterium actinomycetum comitans*, 9 años después, Lieske en 1921 lo denominó como *Bacterium comitans*; Topley y Wilson en el año de 1929, nombraron al microorganismo como: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* siendo este el nombre más característico. Finalmente, en el año 2006 tanto Neils como Mogens, mediante estudios de Ácido desoxirribonucleico (ADN) confirmaron el gran parecido entre cuatro bacterias: *Haemophilus segnis*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Las cuales conforman entre ellas un nuevo género conocido como *Aggregatibacter* ^(4,6).

Esta bacteria posee factores de virulencia, los cuales actúan directamente en el huésped para dar lugar a su proliferación, provocando una destrucción sumamente notable a las células del periodonto. Entre los principales factores de virulencia tenemos ⁽⁷⁾:

- Leucotoxina: actúa sobre los leucocitos especialmente en los polimorfonucleares y macrófagos, formando poros que son transmembranosos, los cuales van a producir la pérdida del potasio, afectando así a las células de defensa disminuyendo la respuesta inmunológica del huésped, facilitando así la colonización de bacterias.
- Endotoxina: es una toxina que activa a los macrófagos los cuales una vez estimulados producen proteínas como la IL1-B y factor de necrosis tumoral alfa, los cuales son los mediadores de la inflamación y reabsorción ósea.
- Epiteliotoxinas: interviene en el mecanismo de profundización e invasión destruyendo los hemidesmosomas de la unión intercelular.
- Citotoxinas: su función es impedir la producción de fibroblastos e intervenir en la síntesis de colágeno del huésped, para la restauración de los tejidos ⁽¹⁾.

Estos factores dan paso a que la cavidad bucal sea colonizada, permitiendo la unión a las células epiteliales y a la hidroxiapatita, además de contribuir a la formación de la biopelícula mediante el siguiente proceso: colonización

específica sobre las líneas de las encías, adhesión en el entorno de la biopelícula, movilización a un nuevo entorno a nivel subgingival y anulación de las defensas mucosas del paciente a este nivel ⁽²⁾.

Esta bacteria se involucra en la enfermedad periodontal debido a que posee fimbrias que contribuyen a que esta se adhiera al tejido blando de la cavidad oral, además de que tiene la capacidad de autoagregarse al biofilm subgingival, y la facultad de impedir las funciones de las células polimorfonucleares, fibroblastos, macrófagos y células del epitelio. Esto hace que la bacteria provoque inflamación e infección en las encías, lo que acabará en la pérdida de los tejidos de soporte dentario ⁽⁸⁾.

Una gran variedad de bacterias se ha encontrado en la placa bacteriana o biofilm, relativamente alrededor de 700 tipos de bacterias, de las cuales, dentro de esa cantidad se encuentra *A. actinomycetemcomitans* localizada en el surco gingival. Su agresividad esta descrita por dichos factores de virulencia, su función es actuar en el periodonto, de manera que activa sus mecanismos de proliferación y destrucción para actuar directamente en el huésped causando afecciones. El daño provocado por esta bacteria es de rápida progresión si se encuentra complementado de biofilm en grandes cantidades alrededor de las inserciones de los dientes, llegando a producir: deterioro, bolsas periodontales, movilidad dentaria, y con el paso del tiempo la pérdida de los mismos ⁽⁹⁾.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue de tipo experimental, transversal, descriptivo. Se determinó la presencia de un gen específico de especie de zonas conservadas del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S para *A. actinomycetemcomitans* mediante el uso de cebadores específicos (Tabla 1). Se trabajó con cepas ATCC 33384 de *A. actinomycetemcomitans*, a esta cepa se la colocó en caldo de cultivo (tripticasa soya), se incubó de 24 a 48 horas (anaerobiosis) ⁽¹⁰⁾.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método de lisis alcalina. Se tomó 1 ml de caldo de cultivo tripticasa soya que contenía a *A. actinomycetemcomitans*, se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm y se eliminó el sobrenadante, después se añadió 50 µl de

solución de lisis formada por dodecilsulfato sódico al 1% en NaOH 0,25 N, se homogeneizó y se calentó por 10 minutos a 98 °C, se agregó 450 µl de agua libre de nucleasas y nuevamente se centrifugó por 20 segundos a 3000 rpm. Una vez extraído el ADN se conservó a -20°C ^(11,12).

Identificación genotípica de *A. actinomycetemcomitans*

Se llevó a cabo la identificación molecular de la cepa de *A. actinomycetemcomitans*, a través de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En la tabla 1 se describen los primers (iniciadores), cebadores que se dirigen a una región específica de especie del gen de ARNr 16S de este patógeno, además del tamaño de los amplicones y las condiciones de la PCR.

El volumen final que se obtuvo de la PCR fue de 20 µl que contenía: 10 µl de Mastermix Go Taq Green 2x de Promega, 1,5 µl de cada primer Forward AaF y Reverse ConR, 5 µl de agua ultrapura y 2 µl de ADN extraído, la amplificación se realizó en un termociclador SimpliAmp de Thermo Fisher, los protocolos se indican en la Tabla 1. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% P/V (50 ml de gel de agarosa con 2 µl de SYBR Safe DNA Gel Stain 10000x de Invitrogen) sobre una cámara de electroforesis horizontal sumergido en buffer TAE 1X a 100 Voltios por 60 minutos, con un Ladder (TrackIt™ de Invitrogen) de 1000 pb, para finalizar se visualizaron en un transiluminador UV y posteriormente fotografiados con una cámara digital ^(11,13).

Aspectos éticos

Desde el punto de vista ético la presente investigación es considerada sin riesgos, debido a que no se trabajaron con muestras clínicas humanas, únicamente se trabajó con cepa ATCC 33384 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Esta investigación es parte del Proyecto de Investigación Formativa "Prevalencia de microorganismos en pacientes con enfermedad periodontal que acuden a la clínica odontológica de la Universidad Católica de Cuenca" de la Carrera de Odontología Matriz. La parte práctica se realizó en el laboratorio de Biotecnología del CIITT con el Grupo de investigación en Genética y Biología Molecular de Microorganismos de la Universidad Católica de Cuenca.

Tabla 1. PCR convencional para la detección de *A. actinomycetemcomitans*

Bacteria	Primers (5'-3')	Tamaño del amplicón	Condiciones	Referencia
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	F: ATTGGGGTTTAGCCCTGGTG R: ACGTCATCCCCACCTTCCTC	360 (pb)	• Desnaturalización a 94 °C por 10 min 35 ciclos de: • 94 °C por 30 s • 55 °C por 30 s • 72 °C por 30 s Extensión final a 72 °C por 10 min	Mujica <i>et al.</i> (2010) Ready <i>et al.</i> (2008)

RESULTADOS

El presente estudio fue realizado con cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384 como se observa en la Figura 1.

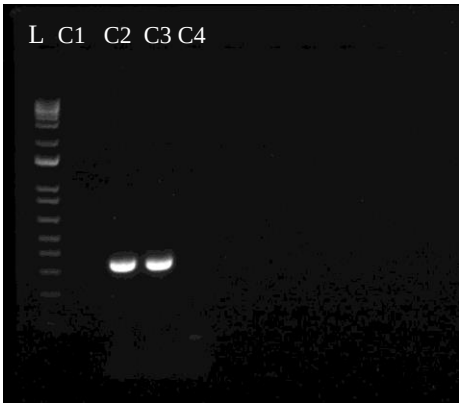


Figura 1. Amplificación para la detección de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. L: Ladder (marcador de peso molecular), C1: Control negativo (cepa de *Tannerella forsythia*), C2: Cepa ATCC 33384 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, C3: Cepa ATCC 33384 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, C4: Control negativo (cepa de *Porphyromonas gingivalis*).

Roles de contribuciones según CRediT

Conceptualización: PPOB, CFAT, MCCD. Metodología: PPOB, CFAT, SMMI, NFLV, CJMD, XJMS, JMTT. Investigación: PPOB, NFLV, CJMD, XJMS, JMTT. Recursos: PPOB, CFAT, MCCD, SMMI, NFLV, CJMD, XJMS, JMTT. Redacción - Borrador original): PPOB, MCCD, NFLV, CJMD, XJMS, JMTT. Redacción - Revisión y edición: PPOB, CFAT, MCCD, SMMI, NFLV, CJMD, XJMS, JMTT.

Fuente de financiamiento: Los autores indican la utilización de fondos de la Universidad Católica de Cuenca del Proyecto de Investigación Formativa para la elaboración de este trabajo de investigación.

Conflictos de interés: Los autores señalan que no existe conflicto de intereses durante la realización del estudio.

DISCUSIÓN

Perfecto D, *et al.*, 2010 ⁽¹⁾, afirma que *A. actinomycetemcomitans* es un microorganismo muy virulento. Su agresividad se debe a los factores estructurales, producción de toxinas y enzimas, lo que concuerda con lo descrito en esta investigación, así mismo Flor *et al.*, 2017, recalca que estimula la reabsorción ósea por sus mecanismos de acción e identifica una nueva molécula llamada GroEl la cual aparentemente actúa de forma directa con las células osteoclasticas ^(1,2).

A. actinomycetemcomitans es una bacteria la cual tiene una prevalencia y rol importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Esto concuerda con lo expuesto por Fine *et al.*, 2019, el cual realizó modelos moleculares y experimentales que demuestran que *A. actinomycetemcomitans* es un colonizador temprano, que puede modular la respuesta inmunitaria local del hospedador y permitir el crecimiento excesivo de otros patógenos, comprobando así la relevancia que tiene en el desarrollo de la enfermedad periodontal ⁽⁴⁾.

Medina *et al.*, 2022, efectuó una revisión bibliográfica para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) donde la muestra se obtuvo de la placa supragingival del borde cervical usando exploradores dentales estériles, cada explorador fue introducido en un tubo estéril con solución salina tamponada con fosfato y transportado en una bolsa de hielo a 4 °C hasta el laboratorio. Finalmente, a través de la PCR se realizó la identificación de *A. Actinomycetemcomitans* ⁽⁷⁾.

Mujica *et al.*, (2010) y Ready *et al.*, (2008) realizaron la identificación de *A. actinomycetemcomitans* mediante la técnica de

PCR, usando los primers ConR y AaF, a diferencia de la presente investigación en que se usó otro método de extracción de ADN (lisis alcalina) obteniendo buenos resultados ^(9,13).

Se llegó a la conclusión que el *A. actinomycetemcomitans* se encuentra asociado en el desarrollo de la enfermedad periodontal, debido a que posee factores de virulencia como la leucotoxina, la cual inhibe la respuesta inmunológica del periodonto, además de fimbrias, que hacen posible la adhesión al tejido blando de la cavidad oral, desencadenando procesos inflamatorios, y con el paso del tiempo presentando manifestaciones clínicas como reabsorción ósea y movilidad de las piezas dentarias. Se determinó que es de gran importancia el diagnóstico temprano de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* debido a su capacidad de adherirse al tejido blando e inhibir la respuesta inmunológica del huésped.

En esta investigación se presenta un método válido de extracción de ADN para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante lisis alcalina, el cual podría ser utilizado al trabajar con muestras clínicas. Así mismo, la identificación de este microorganismo con la técnica de PCR, es específica, sensible y permite detectar en forma rápida y a bajo costo a este microorganismo.

REFERENCIAS

1. Perfecto D, Nakata H, Cadillo E, Rojas A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Patógeno importante en la periodontitis. *Odontol Sanmarquina*. 2010;13(2):42-45. doi: 10.15381/os.v13i2.2882
2. Flor M, Campos O. Susceptibilidad antibiótica del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por medio del test de difusión y dilución. *Dom Cien*. 2017;3(2):348-374. doi: 10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.2.348-3748
3. Ortega S, Sin C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en enfermedad periodontal crónica. *Rev Fac Odontol*. 2012;5(2):13-18. doi: 10.30972/rfo.521663
4. Fine D, Patil A, Velusamy S. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) under the Radar: Myths and misunderstandings of AA and its role in aggressive periodontitis. *Rev Front Immunol*. 2019;10:1-12. doi: 10.3389/fimmu.2019.00728
5. Ortega S, Sin C, Biasio M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en periodontitis crónica en individuos de Corrientes, Argentina: estudio preliminar. *Rev Asoc Odontol Argent*. 2016;104(1):9-15. doi: 10.52979/raoa.1898
6. Benza R, Pareja M. Diagnóstico y tratamiento de la periodontitis agresiva. *Odontostomatología*. 2017;19(30):29-39. doi: 10.22592/ode2017n30a4
7. Medina S, Orellana P, Cuenca K, Andrade C. Métodos de diagnóstico molecular en la práctica odontológica. *Rev Asoc Dent Mex*. 2022;79(5):276-283. doi: 10.35366/107964
8. Ardila M, Arbeláez M, Guzmán I. Perfil microbiológico subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. *Av Periodoncia*. 2012;24(1):47-53. doi: S1699-65825012000100005
9. Mujica T, Ruiz M, Daile L, Fuentesvilla I, Bittner M. Co-detección de patógenos periodontales en pacientes chilenos con periodontitis crónica. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2010;3(3):118-122. doi: S0719-01072010000300003
10. Machado A, Orellana P, Tacuri A. Detección de los genes que codifican para enterotoxinas en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en pantallas de teléfonos móviles de los estudiantes del último año de la carrera de odontología mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Cuenca-Ecuador 2020-2021. *Rev Asoc Dent Mex*. 2021;9(2):1-6. doi: 10.35366/102974
11. Pacheco M, Orellana P, Andrade C, Torracchi J. Virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from cell phone screens of dentistry students in Cuenca-Ecuador. *Genet Mol Res*. 2021;20(3):1-9. doi: 10.4238/gmr18928
12. Núñez T, Pasaca J, Luzuriaga D, Ordóñez J. Microorganismos en enfermedad periodontal. *Rev Cient Univ Odontol Dominic*. 2023;11(2):1-12. doi: 10.5281/zenodo.74868
13. Ready D, Wilson M, Suvan J. Disease Severity Associated with Presence in Subgingival Plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, Singly or in Combination, as Detected by Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):1-4. doi: 10.1128/JCM.01007-08

Paola Patricia Orellana Bravo
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6276-0521>
Correo: porellana@ucacue.edu.ec

Carlos Fernando Andrade Tacuri
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3983-1314>
Correo: candradet@ucacue.edu.ec

Stalin Mauricio Masabanda Ibarra
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7615-9984>
Correo: masabanda@ucacue.edu.ec

María del Cisne Centeno Dávila
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5481-7073>
Correo: mcentenod@ucacue.edu.ec

Javier Marcelo Tenemaza Tiban
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3696-8243>
Correo: javier.tenemaza@est.ucacue.edu.ec

John Xavier Mogrovejo Suarez
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4919-1712>
Correo: jhon.mogrovejo@est.ucacue.edu.ec

Carlos Joaquín Montenegro Delgado
ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-7032-3290>
Correo: carlos.montenegro@est.ucacue.edu.ec

Nathaly Fernanda Ledesma Villacis
ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-8601-9306>
Correo: nathaly.ledesma@est.ucacue.edu.ec