

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: su  
susceptibilidad a los antimicrobianos**

Tesis doctoral  
César Escribano Patón



TESIS DOCTORAL

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans: su  
susceptibilidad a los antimicrobianos***

**Memoria presentada por César Escribano Patón  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona**

Barcelona, Abril 2007



**DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I TERAPÈUTICA  
EXPERIMENTAL**

Facultat de Medicina

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans: su  
susceptibilidad a los antimicrobianos***

*A mi familia.*

*A Susana.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

---

Me gustaría poder expresar en pocas palabras todo mi agradecimiento a aquellas personas que han contribuido de una forma u otra a la realización de este trabajo.

En primer lugar, al Dr. Miguel Viñas, director de la tesis, por confiar en mí desde el primer momento y permitirme trabajar en su grupo de investigación, transmitiéndome toda su experiencia científica y su pasión por la ciencia y la microbiología más concretamente. Gracias por su inestimable ayuda.

A la Dra. Teresa Vinuesa, por la codirección de este trabajo, por saber escucharme y ofrecerme sus consejos y amistad en momentos decisivos.

Al Dr. Roland Benz y sus colaboradores, por acogerme y permitirme trabajar en su grupo de investigación en la Universidad de Wurzburg (Alemania), aconsejándome en la realización de los experimentos de medida de la conductancia de canal simple (*conductance of single channel in black lipid bilayer technique*).

Al Dr. Carles Solsona, director del departamento de Patología y Terapéutica Experimental, por facilitar mi trabajo poniendo a mi disposición todos los medios disponibles.

Al servicio de periodontología de la clínica Odontológica Universitaria de la UB, por permitir el aislamiento de las diferentes cepas clínicas utilizadas en el estudio.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, desde Blanca, Ana, Laura en una primera etapa, a Lúdia López, Ester, Lupe, Magda, Jana, Caterina, Toni, Montse, Luis, Plety, etc., en esta última. Nadie mejor que todos ellos para comprender estas palabras, su contenido y el agradecimiento y emoción que expresan por tantos años de trabajo codo a codo, llenos de pequeñas decepciones y grandes alegrías compartidas. Gracias en especial a Lúdia Ruiz, compañera de viaje inseparable desde el primer día, por su apoyo personal y su amistad.

Por último, quiero darle las gracias a mi familia. A mis padres, mi hermana, Ángel, mi abuela, por confiar en mí, por apoyar todas mis decisiones, hacerlas posibles gracias a vuestro esfuerzo y transmitirme siempre ese aliento necesario que me ha permitido poder llegar hasta aquí. Simplemente vuestra sola presencia en muchos momentos a sido decisiva. Siempre os estaré agradecido.

Y gracias a Susana, mi otra mitad, ella ya sabe todo lo que le debo, no puedo expresarlo aquí con palabras.

Este trabajo de doctorado ha estado financiado por los proyectos SAF2002-00698 y BFU 2006-12268/BFI de los que es investigador principal el Dr. Miguel Viñas. El apoyo durante todos estos años por parte de la Universidad de Barcelona ha facilitado enormemente la realización de este trabajo con la concesión de una beca predoctoral.

*Lo que se debe aprender a hacer se aprende haciéndolo.*

*Aristóteles. 384-322 a.C.*





**Dept. Patologia i Terapèutica Experimental**  
Facultat de Medicina - Campus de la Salut de Bellvitge  
Pavelló Central 5<sup>a</sup> planta  
C. Feixa Llarga s/n  
08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)  
Tel. 93 402 42 49 Fax 93 402 90 82  
e-mail: dep-ptex-bell@ub.edu



**Teresa Vinuesa Aumedes** y **Miguel Viñas Ciordia**, Profesora Titular y Catedrático respectivamente del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona,

H A C E N   C O N S T A R:

Que el trabajo presentado por CÉSAR ESCRIBANO PATÓN titulado *Aggregatibacter actinomycetemcomitans: su susceptibilidad a los antimicrobianos* para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, ha sido realizado bajo nuestra dirección en la Unidad de Microbiología del Departamento. .

Que el trabajo cumple los requerimientos formales y conceptuales para que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste firman el presente en L'Hospitalet de Llobregat a 18 de abril de 2007.

Firmado: Teresa Vinuesa Aumedes

Firmado: Miguel Viñas Ciordia

## ***ÍNDICE***

---

## ÍNDICE

---

|  |    |
|--|----|
| 1. PREFACIO  | 3  |
| 2. INTRODUCCIÓN  | 7  |
| 2.1. El género <i>Aggregatibacter</i>                              | 7  |
| 2.2. <i>Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans</i> | 7  |
| 2.2.1. Clasificación   | 7  |
| 2.2.2. Constituyentes celulares                                    | 8  |
| 2.2.3. Bacteriolisis   | 9  |
| 2.2.4. Genoma  | 10 |
| 2.2.5. Filogenia rRNA16S   | 10 |
| 2.2.6. Hibridación DNA-DNA   | 10 |
| 2.2.7. Hibridación DNA-rRNA  | 11 |
| 2.2.8. Sistemas de tipado  | 11 |
| 2.2.8.1. Serotipado  | 11 |
| 2.2.8.2. Mapas de restricción                                      | 11 |
| 2.2.8.3. Ribotipado  | 12 |
| 2.2.8.4. PCR-RFLP de genes rRNA 16S                                | 12 |
| 2.2.8.5. PCR múltiple  | 12 |
| 2.2.8.6. PCR mediante cebadores arbitrarios                        | 12 |
| 2.2.9. Características morfológicas                                | 12 |
| 2.2.10. Estructura de la pared celular                             | 13 |
| 2.2.11. Propiedades bioquímicas                                    | 14 |
| 2.2.12. Propiedades antigénicas                                    | 15 |
| 2.2.13. Factores de virulencia                                     | 16 |
| 2.2.14. Susceptibilidad  | 18 |
| 2.3. El Periodonto   | 18 |
| 2.3.1. La encía  | 19 |
| 2.3.2. El ligamento periodontal                                    | 19 |
| 2.3.3. El cemento radicular  | 19 |
| 2.3.4. El hueso alveolar   | 19 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4. Las enfermedades periodontales   | 19 |
| 2.4.1. Clasificación  | 19 |
| 2.4.2. Factores de riesgo   | 20 |
| 2.4.3. Aspectos epidemiológicos   | 23 |
| 2.4.4. Aspectos clínicos  | 23 |
| 2.4.5. Diagnóstico clínico  | 24 |
| 2.4.5.1. Periodonto clínicamente sano   | 24 |
| 2.4.5.2. Gingivitis   | 24 |
| 2.4.5.3. Periodontitis  | 25 |
| 2.5. Microbiología de las enfermedades periodontales                                | 25 |
| 2.5.1. Placa bacteriana   | 25 |
| 2.5.2. Microorganismos implicados enfermedades periodontales                        | 25 |
| 2.5.3. Papel de <i>A. actinomycetemcomitans</i>                                     | 26 |
| 2.5.4. El fenómeno de la capacidad de disociación colonial                          | 28 |
| 2.6. Terapia de las enfermedades periodontales                                      | 29 |
| 2.6.1. Higiene oral   | 30 |
| 2.6.2. Terapia mecánica convencional  | 30 |
| 2.6.3. Raspado y alisado subgingival  | 30 |
| 2.6.4. Cirugía periodontal  | 30 |
| 2.6.5. El uso de los antibióticos en la práctica dental                             | 31 |
| 2.6.6. Los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales         | 32 |
| 2.6.7. Terapia antimicrobiana sistémica   | 34 |
| 2.6.8. Terapia antimicrobiana local   | 36 |
| 2.7. La resistencia bacteriana a los antibióticos en las enfermedades periodontales | 36 |
| 2.8. Bombas de reflujo  | 37 |
| 2.9. Integrones   | 38 |
| 2.10. Las proteínas de la membrana externa  | 40 |
| <br>  |    |
| 3. OBJETIVOS  | 43 |

---

|   |    |
|---|----|
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS   | 47 |
| 4.1. Cepas bacterianas  | 47 |
| 4.2. Medios de cultivo  | 48 |
| 4.3. Tratamiento de las muestras  | 50 |
| 4.3.1. Recogida de muestras   | 50 |
| 4.3.2. Procesamiento  | 50 |
| 4.4. Identificación de <i>A. actinomycetemcomitans</i>  | 51 |
| 4.5. Preparación de las soluciones  | 52 |
| 4.5.1. Antibióticos   | 52 |
| 4.5.2. Colorantes   | 53 |
| 4.5.3. Detergentes  | 53 |
| 4.5.4. Inhibidor metabólico   | 53 |
| 4.6. Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos   | 54 |
| 4.6.1. Antibiograma   | 54 |
| 4.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria   | 55 |
| 4.6.2.1. Dilución en agar   | 55 |
| 4.6.2.2. Dilución en caldo  | 56 |
| 4.6.2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en condiciones de inhibición del reflujo                | 56 |
| 4.7. Experimentos de reflujo  | 57 |
| 4.7.1. Ensayos de crecimiento   | 57 |
| 4.7.2. Ensayos de inhibición del crecimiento  | 57 |
| 4.7.3. Efecto de la concentración de antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano, en presencia y ausencia de CCCP | 58 |
| 4.8. Análisis de proteínas de membrana externa  | 58 |
| 4.8.1. Aislamiento de proteínas de membrana externa   | 58 |
| 4.8.2. Purificación de las porinas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>   | 59 |
| 4.8.3. Análisis de las proteínas por SDS-PAGE   | 60 |
| 4.8.3.1. Preparación de los geles de poliacrilamida   | 60 |
| 4.8.3.2. Recorrido de las muestras  | 62 |
| 4.8.3.3. Tinción de los geles   | 62 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.8.4. Medida de la conductancia de canal simple                              | 63        |
| 4.8.4.1. Evaluación de la dependencia de voltaje<br>y selectividad de canal   | 65        |
| 4.8.4.2. Estimación del diámetro de canal                                     | 65        |
| 4.9. Técnicas de extracción de DNA  | 66        |
| 4.9.1. Extracción de DNA cromosómico  | 66        |
| 4.10. Técnicas de cuantificación y visualización de DNA                       | 69        |
| 4.10.1. Cuantificación de DNA   | 69        |
| 4.10.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa                             | 69        |
| 4.10.3. Electroforesis de campo pulsante (PFGE)                               | 71        |
| 4.11. Técnicas de manipulación de DNA   | 73        |
| 4.11.1. Preparación de muestras para PFGE                                     | 73        |
| 4.11.2 Amplificación de un fragmento de DNA por PCR                           | 75        |
| 4.11.2.1. Amplificación de <i>acrAB</i>                                       | 76        |
| 4.11.2.2. Búsqueda de integrones de clase I.                                  | 77        |
| 4.11.3. Precipitación de DNA  | 78        |
| 4.11.4. Recuperación de DNA a partir de geles de agarosa                      | 78        |
| 4.11.5. Purificación productos de PCR   | 78        |
| 4.11.6. Secuenciación de genes  | 78        |
| 4.11.7. Comparación y alineación de secuencias                                | 80        |
| <br>  |           |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSION</b>  | <b>83</b> |
| <hr/>   |           |
| 5.1. Crecimiento de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>              | 83        |
| 5.2. El modo de crecimiento   | 84        |
| 5.3. El crecimiento colonial de <i>A. actinomycetemcomitans</i>               | 86        |
| 5.4. La susceptibilidad de <i>A. actinomycetemcomitans</i> a los antibióticos | 88        |
| 5.4.1. MIC en medio líquido   | 88        |
| 5.4.2. MIC en medio sólido  | 91        |
| 5.4.3. Cálculo de las MIC con aglutinación bloqueada                          | 93        |
| 5.5. Análisis de las proteínas de membrana externa por SDS-PAGE               | 95        |
| 5.5.1. La porina de <i>A. actinomycetemcomitans</i>                           | 96        |

|  |     |
|--|-----|
| 5.6. Medida de la conductancia de canal simple de Omp 39 | 97  |
| 5.6.1. Estimación diámetro canal Omp39                   | 104 |
| 5.7. Búsqueda de integrones de clase I                   | 105 |
| 5.8. Búsqueda de plásmidos de gran tamaño                | 105 |
| 5.9. Demostración de la capacidad de reflujo             | 105 |
| 5.9.1. Ensayos de inhibición del crecimiento             | 106 |
| 5.9.2. Sensibilidad a antimicrobianos con y sin CCCP     | 106 |
| 5.9.3. Amplificación de la región <i>acrAB</i>           | 109 |
| 5.9.4. Secuenciación del gen <i>acrAB</i>                | 109 |
| <hr/> 6. CONCLUSIONES                                    | 119 |
| <hr/> 7. BIBLIOGRAFÍA                                    | 123 |

## ***1. PREFACIO***

---





## 1. PREFACIO

Este trabajo de doctorado se ha realizado en una sección de un Departamento en el que coexisten la investigación y la docencia de diversas enseñanzas de Ciencias de la Salud: Medicina, Odontología, Podología y Enfermería. La proximidad con los estudios de dentistería, nos llevó a interesarnos por una bacteria ciertamente singular, que entonces se denominaba *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y que durante el desarrollo de la tesis cambió su nombre por el de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

El grupo de investigación que me acogió (el grupo del profesor Miguel Viñas) se dedica desde muchos años atrás al estudio de los mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos. Los dentistas son posiblemente, de entre los prescriptores de antibióticos, aquellos que lo hacen con menor conocimiento de causa, dada la poca investigación desarrollada en este campo. Las periodontitis, frecuentemente se tratan con antibióticos aunque su uso no está justificado ni existen publicaciones que demuestren su efectividad. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* parece ser el agente etiológico de una de las formas más agresivas de periodontitis.

Parecía pues más que justificado abordar un estudio bien fundamentado aprovechando la experiencia del grupo para intentar comprender las peculiares relaciones entre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y los antibióticos. La memoria que ahora presentamos recoge los principales resultados de este trabajo.

L'Hospitalet de Llobregat. Abril de 2007.



## ***2. INTRODUCCIÓN***

---



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El género *Aggregatibacter*

*Aggregatibacter* es un género bacteriano de cortísima “vida”, pues su creación fue propuesta en septiembre del pasado año [1]. Procede del antiguo genero *Actinobacillus* pero comprende únicamente una especie y algunos biotipos de dudosa entidad taxonómica. A lo largo de este trabajo nos referiremos esencialmente a *Aggregatibacter*, aunque por razones obvias no es posible omitir de modo completo la antigua nomenclatura.

### 2.2. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*

#### 2.2.1. Clasificación

En la novena edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [2], *A. actinomycetemcomitans* se consideraba un miembro del género *Actinobacillus* perteneciente a la familia *Pasteurellacea* que incluía seis géneros, entre ellos: *Pasteurella*, *Actinobacillus* y *Haemophilus*, existiendo poca consistencia fenotípica dentro de cada uno. La filogenia y taxonomía de la familia ha sido siempre problemática.

La segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. II [3], no incluye a *A. actinomycetemcomitans* en el género *Actinobacillus sensu stricto*, sino que lo sitúa en uno de los cluster que representan potenciales géneros adicionales: el *Cluster Aphrophilus*, en el que se incluyen también *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, y *H. segnis*. Por estudios de homología de DNA y determinación y comparación de secuencias de rRNA 16S, *A. actinomycetemcomitans* aparece más íntimamente ligado a *Haemophilus aphrophilus* y *H. paraphrophilus* que al resto de los *Actinobacillus spp.* [4]. Sin embargo, fenotípicamente difiere bastante de la especie tipo del género *Haemophilus* (no requiere hemina ni NAD para su crecimiento).

Al determinar las secuencias rRNA 16S de más de 70 cepas pertenecientes a especies de la familia *Pasteurellaceae*, se encontró que las cepas se podían localizar en 7

clusters diferentes [5]. El primero, contiene las cepas tipo de *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. aphrophilus*, *H. haemolyticus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis* y *A. actinomycetemcomitans*. El género *Actinobacillus sensu stricto* se hallaría en el cuarto cluster incluyendo las cepas tipo de *A. lignieresii*, *A. equuli*, *A. pleuropneumoniae*, *A. suis*, *A. ureae*, *A. hominis*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. ducreyi* y *Mannheimia haemolytica*.

De todas las especies relacionadas, sólo *A. actinomycetemcomitans* se aísla a partir de muestras de la cavidad oral humana pero no en la de otros animales [6], siendo un patógeno periodontal, asociado principalmente a la periodontitis juvenil localizada, como comentaremos más adelante [7].

### 2.2.2. Constituyentes celulares

Ácidos grasos: Los patrones de ácidos grasos determinados por cromatografía de gases en la familia *Pasteurellaceae* aparecen homogéneos con tan solo variaciones menores. Utilizando columnas con fase estacionaria no polar, que permiten el análisis de los ácidos grasos libres, los aislamientos de *A. actinomycetemcomitans* se pueden dividir en tres grupos, mientras que los de *H. aphrophilus* aparecen homogéneos.

El contenido lipídico del lipopolisacárido (LPS) de *A. actinomycetemcomitans* constituye el 35.4% mientras que en *H. aphrophilus* representa solo el 18.4% [8]. Los ácidos 3 hidroxitetradecanoico y tetradecanoico, únicos constituyentes del LPS constituyen un 21.1% y 14.3% respectivamente del contenido total de ácidos grasos en *A. actinomycetemcomitans*, representando un 10.9% y 7.5% respectivamente en *H. aphrophilus*. Las diferencias observadas en el contenido lipídico de estos ácidos podrían explicar en parte el potencial periodontopatogénico de la primera especie.

Al analizar los ácidos grasos de las vesículas de membrana externa en especies de *Actinobacillus*, *Haemophilus* y *Pasteurella*, se observó que *A. actinomycetemcomitans* podía asignarse a un grupo (Clase I), con dos subgrupos, y *H. influenzae* a otro (Clase II). *Pasteurella multocida* aparecía claramente diferenciada de ambos [9].

La abundancia de ácidos grasos con tres grupos hidroxilo indica que las vesículas de la membrana externa son ricas en LPS.

Lipoquinas: El contenido de lipoquina se puede utilizar para discriminar entre grupos de la familia *Pasteurellaceae*. *Actinobacillus* presenta alto contenido de menaquinona-7

(MK-7), (30%) y demetilquinona-7 (DMK-7), (54%), mientras que *Haemophilus* contiene principalmente DMK-6 con pequeñas cantidades de MK-8 y DMK-7. *A. actinomycetemcomitans* y *H. aphrophilus* presentan un perfil similar al de *Haemophilus* pero no contienen MK-8.

Carbohidratos: Los patrones de azúcares celulares, establecidos por cromatografía de gases de las células completas tras metanolisis y derivación con ácido tricloroacético, permiten diferenciar *A. actinomycetemcomitans* y *H. aphrophilus* por la ausencia de D-glicero-D-manoheptosa en el segundo [10]. Posteriores caracterizaciones químicas y enzimáticas han demostrado que la D-glicero-D-manoheptosa, cuya principal fuente es el LPS, puede servir como marcador taxonómico para dichos microorganismos [11].

Proteínas: La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas de las células enteras, permite la diferenciación entre *A. actinomycetemcomitans* y *H. aphrophilus* [12]. Cuando se comparan sus proteínas de membrana externa por SDS-PAGE y *western-blot* con antisuero de conejo, destaca la ausencia de la proteína termo-modificable (*OmpA*) en *H. aphrophilus* [13], en cambio en *A. actinomycetemcomitans* dicha proteína presenta homología N-terminal y reactividad inmunológica cruzada con las proteínas *OmpA* de otras bacterias Gram negativas [14].

Mediante el estudio de 19 actividades enzimáticas (API-ZYM) se ha dividido a *A. actinomycetemcomitans* en dos grupos, permitiendo además la diferenciación con otras especies (*H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus*).

### 2.2.3. Bacteriolisis

Al estudiar la inducción de bacteriolisis mediada por el ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) y por la lisozima de huevo, se observa que *A. actinomycetemcomitans* se lisa con mayor facilidad que *H. aphrophilus* y que mientras éste presenta un patrón homogéneo, en el primero se pueden distinguir dos grupos según su respuesta.

El análisis multivariante de 41 variables cuantitativas, incluyendo datos de cinéticas de lisis, contenidos de carbohidratos y ácidos grasos, reducción de azul de metileno y



estudio de actividades enzimáticas, permite dividir los aislamientos de *A. actinomycetemcomitans* en dos grandes grupos [15].

#### 2.2.4. Genoma

Utilizando electroforesis de campo pulsante (PFGE) se ha encontrado que el genoma de *A. actinomycetemcomitans* contiene un único cromosoma de 2.3 Mb, estimado de la suma de los fragmentos de restricción generados al utilizar endonucleasas de corte [16]. Ocasionalmente se han detectado plásmidos grandes de 35-300 Kb. Los elementos extracromosómicos en algunas cepas representan más del 20% del total del material genético.

#### 2.2.5. Filogenia rRNA16S

La filogenia de la familia *Pasteurellaceae* ha sido determinada por comparación de las secuencias rRNA16S. Como se ha mencionado anteriormente la familia se ha dividido en siete clusters. La especie tipo de *A. actinomycetemcomitans* se sitúa en el primero de ellos junto con *H. aphrophilus* entre otros.

#### 2.2.6. Hibridación DNA-DNA

Se ha utilizado para determinar las relaciones genéticas dentro y entre los géneros de la familia *Pasteurellaceae*. Basándose en estudios de homología de DNA [17], se ha sugerido que *A. actinomycetemcomitans* no se incluyera en el género *Actinobacillus*. También se ha reconocido que *A. actinomycetemcomitans* es distinto de *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus* [18]. Utilizando la hibridación DNA-DNA para identificar aislamientos clínicos de ambas especies [19], se obtuvieron los mismos resultados que se corroboraron mediante estudios de transformación inter e intra especies. También se obtuvo la diferenciación entre ambas especies con la hibridación utilizando sondas de DNA genómico total. [20].

### 2.2.7. Hibridación DNA-rRNA

Estudios de hibridación DNA-rRNA han demostrado la existencia de como mínimo siete ramas en la familia *Pasteurellaceae* [21]. La ramificación que incluye *A. actinomycetemcomitans*, *H. aphrophilus*, y *H. ducreyi*, aparece separada y bastante alejada de los tres géneros clásicos de la familia.

Cuando se digiere el DNA cromosómico de *A. actinomycetemcomitans* con las endonucleasas de restricción *ClaI*, *BamHI*, *BglII* o *HindIII* y se hibrida con el operón RNA ribosomal *rrnB* del cromosoma de *E. coli*, los aislamientos de un mismo paciente pertenecientes al mismo serotipo aparecen idénticos, pero los de serotipos distintos no lo son. [22]. Los aislamientos de pacientes distintos nunca son idénticos.

### 2.2.8. Sistemas de tipado

#### 2.2.8.1. Serotipado

Utilizando antisuero de conejo serotipo específico contra *A. actinomycetemcomitans*, se serotiparon 177 aislamientos de dicho microorganismo procedentes de 136 individuos periodontológicamente sanos y enfermos, mediante técnicas de inmunofluorescencia y/o inmunodifusión [23], demostrándose que la mayoría de individuos presentaban un único serotipo y que las infecciones eran relativamente serotipo estables.

#### 2.2.8.2. Mapas de restricción

El análisis de restricción con endonucleasas es un instrumento útil para tipar y discernir la heterogenicidad entre cepas de *A. actinomycetemcomitans* [24].

Al estudiar el DNA genómico de 31 cepas de *A. actinomycetemcomitans* mediante la detección del polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), se obtuvieron 29 tipos, encontrándose fragmentos serotipo específicos [25].

El RFLP se ha utilizado para el estudio de la epidemiología y patogénesis de *A. actinomycetemcomitans* [26], apareciendo el tipo B como particularmente virulento, asociado a periodontitis juvenil localizada.

### 2.2.8.3. Ribotipado

Comparando seis métodos distintos de tipado [27], se obtiene una diferenciación inequívoca entre las diversas cepas. Con dicha técnica se demuestra similitud intrafamiliar entre aislamientos de *A. actinomycetemcomitans* [28] y permite la separación entre *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *A. actinomycetemcomitans* [29].

### 2.2.8.4. PCR-RFLP de genes rRNA 16S

El análisis de los fragmentos de restricción de los genes rRNA 16S amplificados tras PCR, permite distinguir fácilmente *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *A. actinomycetemcomitans* [30].

### 2.2.8.5. PCR múltiple

Se ha desarrollado una PCR múltiple que permite identificar los cinco serotipos de *A. actinomycetemcomitans* [31].

### 2.2.8.6. PCR mediante cebadores arbitrarios (*random primers*) (AP-PCR)

Se ha comprobado que los aislamientos de *A. actinomycetemcomitans* de un genotipo determinado por AP-PCR generalmente pertenecen al mismo serotipo [32].

### 2.2.9. Características morfológicas

La morfología observada por microscopía óptica de *A. actinomycetemcomitans* es la de un coco-bacilo Gram-negativo no esporulado, inmóvil de aproximadamente 0.7 x 1 µm de tamaño, encontrándose aislado, en parejas o en pequeños racimos [33]. Las formas bacilares se suelen observar con mayor frecuencia a partir de los cultivos, mientras que las formas cocoides suelen aparecer en las observaciones directas de las muestras procedentes de las lesiones.

Es un microorganismo capnofílico, que se cultiva bien (aunque no exento de ciertas dificultades si se compara con bacterias próximas) en atmósfera con un contenido de CO<sub>2</sub> del 5-10% [34] o en condiciones de anaerobiosis [35].

Esta bien descrito que en medios sólidos forma colonias de aproximadamente 0.5-1mm de diámetro, translúcidas y con perímetros irregulares que le confieren una forma característica de estrella, con superficie rugosa [33]. Cuando las colonias se resiembran repetidamente en el laboratorio, la morfología inicial rugosa y transparente, fuertemente adherida al agar, puede derivar a una morfología más lisa y opaca, no adherente. Este cambio de morfología se debe a la pérdida de expresión de las fimbrias [36] [37] [38], que por otro lado se han revelado como importantes factores de virulencia. A diferencia de otros miembros del género, no crece en agar Mc. Conkey [33]. En el capítulo de resultados y discusión volveremos sobre la morfología colonial.

En medios líquidos las colonias primarias crecen formando gránulos que se adhieren a las paredes y al fondo de los tubos, perdiendo ocasionalmente la capacidad de adhesión tras pases sucesivos en el laboratorio, exhibiendo una turbidez homogénea. La viabilidad es limitada [39].

#### 2.2.10. Estructura de la pared celular

Presenta la pared celular típica de los microorganismos Gram negativos. Posee una membrana citoplasmática interna, un espacio periplasmático y una membrana citoplasmática externa con presencia de lipopolisacáridos [40] recubiertos por microcápsulas de hidratos de carbono [41] así como fimbrias, vesículas y material amorfo extracelular.

Otras estructuras importantes en *A. actinomycetemcomitans* son sus vesículas, de naturaleza lipopolisacáridica y formadas directamente a partir de la membrana externa. Se liberan al medio externo en grandes cantidades [40]. La leucotoxicidad de la superficie externa de *A. actinomycetemcomitans* está relacionada proporcionalmente según varios autores con el nivel de liberación de vesículas al medio externo [42] [43]. Además, las vesículas presentan otros componentes biológicamente activos como endotoxinas [44] compuestos con actividad sobre la reabsorción ósea y una bacteriocina designada como actinobacilina [43]. Estas vesículas tienen también propiedades adhesivas, lo que sugiere la hipótesis de que podrían ser vesículas de liberación de materiales tóxicos para *A. actinomycetemcomitans* [45].

Ciertas células de *A. actinomycetemcomitans* presentan en su superficie un material amorfo que frecuentemente permite su agregación con otras células adyacentes

formando una especie de matriz [40]. Algunos estudios constatan que dicho material extracelular puede observarse en cultivos líquidos [46] [47]. Su producción podría estar asociada al crecimiento de las células en medios con triptona [47]. Así, su expresión y liberación estaría determinada por las condiciones de cultivo.

Este material amorfo corresponde a una proteína, probablemente una glicoproteína que demuestra tener propiedades de adhesión [45] y reabsorción ósea [47], y es fácilmente eliminada lavando la suspensión celular con un tampón fosfato. Al eliminar dicho material amorfo del cultivo, las bacterias presentan una reducción importante de su capacidad de adhesión a células epiteliales y de co-agregación [45].

#### 2.2.11. Propiedades bioquímicas

Las propiedades bioquímicas de *A. actinomycetemcomitans* están publicadas en numerosos estudios [48] [35] [49] [50] [51]. Es un microorganismo oxidasa negativo, reductor de nitratos, productor de fosfatasas ácidas y alcalinas, fermentador, no hemolítico, indol negativo y productor de catalasa. Puede distinguirse de otras bacterias como las pertenecientes al género *Haemophilus*, por no precisar factores de crecimiento como la hemina (factor X) y/o nicotinamida adenina dinucleótido NAD (factor V). Puede diferenciarse también de otros microorganismos independientes de los factores X y V, como por ejemplo *Haemophilus aphrophilus*, por su producción de catalasa, fermentación de carbohidratos específicos como el almidón, sacarosa, trehalosa etc. La fermentación de la lactosa distingue ambos microorganismos ya que *A. actinomycetemcomitans* es lactosa-negativo y *H. aphrophilus* lactosa-positivo [51]. *Haemophilus aphrophilus* produce específicamente algunos enzimas como  $\beta$ -glucosidasa o  $\beta$ -galactosidasa [50]. Basándose en estas diferencias, Alcoforado *et al.*, [52], presentaron un método rápido para la detección de microorganismos fermentadores de la lactosa, el test MUG (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidasa), que puede ser utilizado directamente sobre las colonias. La reacción resultante se observa a través de la luz ultravioleta. Las colonias de *H. aphrophilus*, muestran una fluorescencia luminosa, que no aparece en las colonias lactosa-negativas de *A. actinomycetemcomitans*.

La fermentación de azúcares tales como dextrina, galactosa, maltosa, manitol, xilosa, etc., se utiliza taxonómicamente para subclasificar *A. actinomycetemcomitans* en subtipos denominados biotipos [53].

Para diferenciar las cepas de *A. actinomycetemcomitans* procedentes de la cavidad oral de otras de diferentes orígenes, se han utilizado diversas técnicas como: el análisis de ácidos grasos, modelos de proteínas solubles y experimentos de hibridación de DNA. Algunos investigadores [54] [55] [12] postulan que las técnicas que utilizan modelos de proteínas solubles en geles de poliacrilamida no son útiles para discriminar entre subgrupos dentro de la especie, pero sí lo son para distinguir *A. actinomycetemcomitans* de *H. aphrophilus*.

#### 2.2.12. Propiedades antigénicas

La mayor parte de las estirpes de *A. actinomycetemcomitans* presentan polisacáridos en su superficie, portadores de determinados serotipos específicos. En este momento hay cinco serotipos diferenciados: *a*, *b*, *c*, *d*, y *e*. [56] [57] [58] [59].

Los serotipos *a* y *b* son los más frecuentemente aislados de la cavidad oral; el serotipo *b* se asocia con periodontitis, producción de  $\beta$ -lactamasa, bacteriemia y endocarditis, mientras que el serotipo *c* se ha relacionado con infecciones extra-orales y se aísla ocasionalmente de bocas sanas [60].

Los serotipos *a*, *b* y *c* presentan una divergencia filogenética mayor que la encontrada entre muchas especies, lo cual podría conducir al establecimiento de subespecies en estos serotipos, sin embargo todavía no se han determinado las secuencias de todos los serotipos conocidos.

Estudios efectuados por Gunsolley *et al.*, [61], demostraron que la periodontitis agresiva se asocia a la presencia de serotipos *b* y *e* en individuos de etnias negras, mientras que en individuos euroasiáticos el serotipo más frecuente es el *a*.

También se ha encontrado una relación semejante entre el serotipo predominante en la periodontitis juvenil localizada (ahora denominada periodontitis agresiva localizada), el serotipo *b*, y el serotipo predominante en el periodonto de individuos sanos adultos, serotipo *c* [23]. En estos estudios, la mayoría de pacientes con periodontitis juvenil localizada eran americanos de origen africano. Esto no es sorprendente si consideramos que la mayoría de estudios descritos son efectuados sobre población americana, y que

los individuos afroamericanos presentan un mayor riesgo de desarrollar periodontitis juvenil localizada [62] [63] [64] [65] [66]. De hecho, una de las cepas utilizadas en este trabajo (AC05) procede de un caso de periodontitis agresiva juvenil localizada en una mujer de color de Portugal [67].

Varios estudios [68] [69] [58], demostraron que los individuos pueden estar infectados por más de un serotipo. Saarela *et al.*, [58], encontraron la misma distribución de los serotipos *b* y *e* en la población finlandesa, en la que el serotipo *d* era mucho más raro.

Finalmente, se ha sugerido que estas contradicciones entre estudios pueden estar relacionadas con las diferentes formas de infección por *A. actinomycetemcomitans* en la población, y con factores étnicos.

### 2.2.13. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los mecanismos por los que un microorganismo puede colonizar un nicho u hospedador, superar sus defensas e iniciar un proceso infeccioso. Los microorganismos con mayor número de factores de virulencia, son por tanto, los más patógenos.

Existen numerosos estudios que relacionan la virulencia de *A. actinomycetemcomitans* y su frecuente definición como agente etiológico de infecciones periodontales y algunas extra-orales. En la figura 2.2.13, se presenta un esquema general de los diferentes factores de virulencia que podemos encontrar en *A. actinomycetemcomitans*.

La leucotoxina es el factor de virulencia mejor estudiado de *A. actinomycetemcomitans* [70]. Se trata de un producto proteasa-sensible, termolábil, cuya dimensión está entorno a 115.000 daltons [71], que lisa los leucocitos polimorfonucleares [72] [73], los monocitos [74], así como los neutrófilos de la línea promielótica HL-60 [41], causando la desorganización de su membrana celular. También presenta actividad colagenolítica [75].

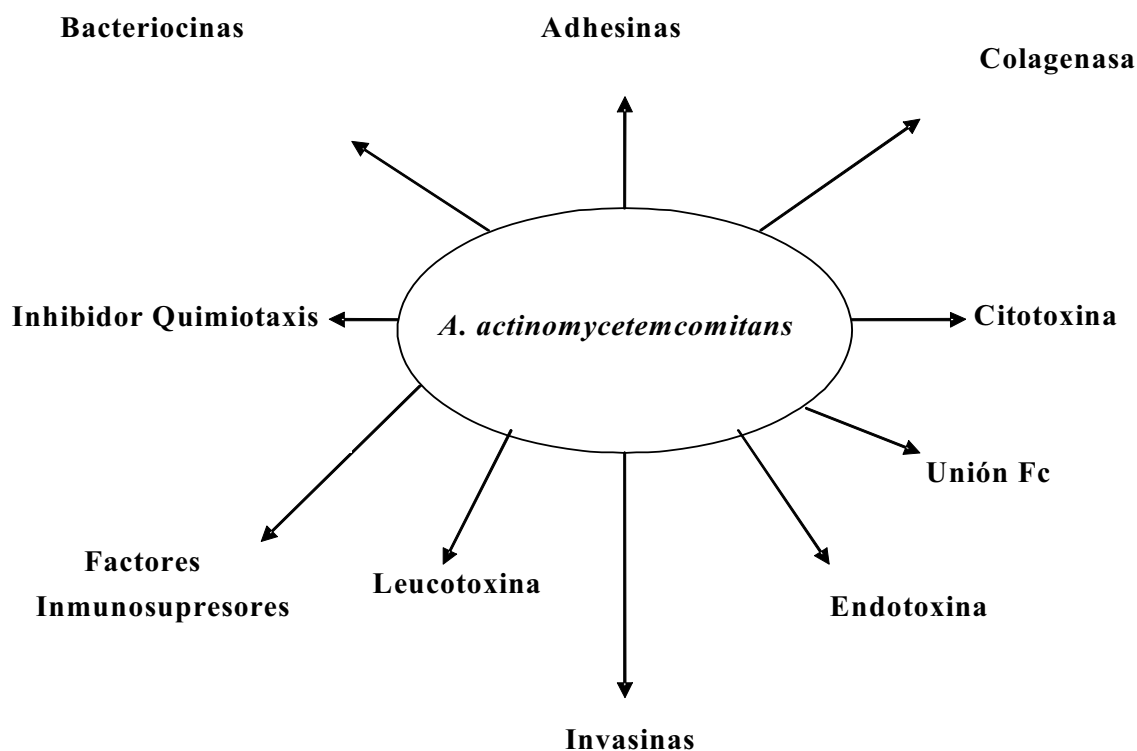


Figura 2.2.13. Esquema de los posibles factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans*: Bacteriocinas [76] [77], adhesinas [46] [78], colagenasa [75], inhibidores de la quimiotaxis [79] [80], citotoxina [81] [82], factores inmunosupresores [83] [84] [85], leucotoxinas [70] [72], invasinas y endotoxinas [86] [87].

El efecto leucotóxico no se ve afectado significativamente por el suero de los individuos sanos, pero sí inhibido por el suero de individuos con periodontitis juvenil localizada [88] [89] y por el suero de caballo inmunizado contra *A. actinomycetemcomitans* [56]. Esto indica que la presencia de anticuerpos contra la leucotoxina en individuos afectados de periodontitis juvenil localizada, es una de las respuestas inmunitarias naturales a nivel humoral [56].

No todas las estirpes de *A. actinomycetemcomitans* producen niveles significativos de leucotoxina; algunas lo hacen de forma esporádica o variable [90] [91] [56] [71]. Existen *A. actinomycetemcomitans* productoras y no productoras de leucotoxina. En individuos sanos, el 7% de los *A. actinomycetemcomitans* presentes en la flora oral, son productores de leucotoxina, mientras que en individuos con enfermedad periodontal entre un 43-75% producen leucotoxina I [90] [56].

Según Slots *et al.*, [38], la elevada tasa de leucotoxina presente en muestras de individuos afectados por periodontitis juvenil localizada, es debida precisamente a la



presencia masiva de *A. actinomycetemcomitans* que destruyendo los leucocitos polimorfonucleares y provocando la liberación de enzimas hidrolíticos son capaces de potenciar la destrucción de los tejidos locales.

Las estirpes productoras de leucotoxina tienen mayores probabilidades de presentar resistencia a los enzimas hidrolíticos de los leucocitos que no las no productoras. Sela y Romano, [92], demostraron que extractos enzimáticos procedentes de leucocitos humanos causaban mayor desgaste en la pared celular y citoplasma de estirpes no leucotóxicas de *A. actinomycetemcomitans*.

La base molecular de la producción de leucotoxina así como la regulación de su producción no se conocen todavía. Se sabe que algunas estirpes de *A. actinomycetemcomitans* poseen plásmidos [93], y que otras son infectadas por bacteriófagos [94]. Ambos son factores modeladores de la producción de toxina en otras especies bacterianas [95] [96], pero ello no implica que la aparente correlación de estos dos factores con la producción de toxinas se dé también en *A. actinomycetemcomitans* para la producción de leucotoxina. Otra correlación posible sería la producción de leucotoxina y la liberación de vesículas, ya que está comprobado que las estirpes productoras de leucotoxina presentan mayores concentraciones de vesículas en la membrana externa [42].

#### 2.2.14. Susceptibilidad

En estudios de susceptibilidad a antimicrobianos realizados en un número limitado de aislamientos, se ha encontrado que *A. actinomycetemcomitans* se muestra sensible a cefalosporinas, tetraciclinas y fluoroquinolonas, describiéndose resistencias a penicilina, amikacina y macrólidos [59] [97] [98] [99].

### 2.3 El Periodonto

Es la estructura responsable de la sujeción del diente, constituido por diferentes estructuras como la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar [100].

### **2.3.1. La encía**

Es la parte de la mucosa oral que recubre la apófisis del hueso alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. En sentido coronario, termina con el margen (o borde) gingival, y, en sentido apical, se continua con la mucosa alveolar.

### **2.3.2. El ligamento periodontal**

Es la estructura de tejido conjuntivo situada entre el cemento y la lámina dura alveolar. Está formado principalmente por fibras de colágeno, células fibroblásticas y una matriz amorfa.

### **2.3.3. El cemento radicular**

Es un tejido calcificado especializado, que recubre las superficies radiculares de los dientes y, ocasionalmente, pequeñas porciones de sus coronas. Posee muchas características en común con el tejido óseo.

### **2.3.4. El hueso alveolar**

Se define como las partes del maxilar y de la mandíbula que forman y dan soporte a los alvéolos de los dientes. Se desarrolla asociado a la erupción dentaria y es gradualmente reabsorbido con la pérdida de los dientes.

## **2.4. Las enfermedades periodontales**

El concepto de enfermedad periodontal ha sido modificado con la evolución de los conocimientos sobre la misma, abarcando actualmente, un elevado número de patologías que afectan a los tejidos gingival, conjuntivo y óseo [101].

### **2.4.1. Clasificación**

De una forma general, la clasificación de las enfermedades periodontales tiene como objetivo la organización sistemática y diferenciada de los conocimientos sobre grupos

de patologías que afectan determinados órganos o sistemas, de cara a normalizar la conducta terapéutica.

Han sido propuestas diferentes clasificaciones a lo largo de los años, cada vez que se ha avanzado en nuevos conocimientos respecto a la etiología y la patogenia de las enfermedades periodontales [102] [103]. Las más recientes clasificaciones se han basado en las características clínicas, radiológicas, microbiológicas e histopatológicas de cada enfermedad, junto con la respuesta del huésped y su etiología [104].

La Academia Americana de Periodontología ha seguido la evolución de los conocimientos sobre diferentes tipos de enfermedades periodontales, sugiriendo clasificaciones que procuran armonizar la diversidad de opiniones sobre la naturaleza de los procesos patológicos a clasificar.

#### 2.4.2. Factores de riesgo

En el sentido de promover una actitud preventiva, en lo que respecta a los cuidados de salud, la identificación de los factores de riesgo de las enfermedades, de una forma general, ha cautivado la atención de los investigadores y profesionales de la salud. El conocimiento de esos factores y su erradicación o disminución, permiten con mayor o menor eficacia, evitar la aparición o reducir el desarrollo de múltiples patologías.

Beck *et al.*, [105], definieron tres grandes grupos de factores de riesgo para las enfermedades periodontales: factores ambientales, hábitos y factores biológicos.

De igual forma, han sido propuestos diferentes modelos etiológicos para las enfermedades periodontales.

Desde 1960, se acepta de forma general, la asociación entre la presencia de la denominada placa bacteriana subgingival con la aparición de enfermedad periodontal. En este sentido, Loe *et al.*, [106], establecieron la asociación entre la acumulación de placa supragingival y el desarrollo de la gingivitis. También Lindhe *et al.*, [107], en estudios experimentales utilizando perros, pudieron observar que una acumulación prolongada de placa bacteriana, permite la propagación de bacterias de la zona subgingival, promoviendo la continuidad del proceso inflamatorio, causando pérdida de inserción del tejido conjuntivo y, de esta forma, induciendo la aparición de periodontitis. Estos trabajos son todavía hoy una referencia, pues establecen una relación causa-efecto directa entre la existencia de placa bacteriana y la aparición de

enfermedades periodontales, demostrando también que un control adecuado de la placa promueve la salud periodontal.

Los hábitos deficientes en la higiene oral son considerados factores de riesgo porque contribuyen, de forma significativa, a los altos índices de placa bacteriana. Trabajos desarrollados en Kenia por Baelum *et al.*, [108], confirmaron que la higiene oral deficiente facilita, no sólo el aumento de placa y cálculo dentario, sino también la progresión de la gingivitis. Hábitos de higiene correctos previenen la aparición de gingivitis y, aplicados a largo plazo, modifican la cantidad y composición de la placa bacteriana subgingival, lo que reduce de pérdida de adherencia de los dientes [109].

También la presencia específica de determinadas bacterias como *A. actinomycetemcomitans* en pacientes jóvenes, es un indicador de riesgo para el desarrollo de enfermedad periodontal [110].

Beck *et al.*, [111], asociaron la presencia de *P. gingivalis* al elevado riesgo de progresión y severidad de la enfermedad periodontal. Shiloah *et al.*, [112], demostraron la alta probabilidad de aislar *Tannerella forsythia* (*B. forsythus*) y *P. gingivalis* a partir de pacientes con periodontitis crónica que continuaban tratándose, aislándose con mayor frecuencia *Tannerella forsythia* en pacientes con enfermedades periodontales activas que inactivas [113].

Timmerman *et al.* [114], definieron tres factores de riesgo fundamentales para la aparición de periodontitis agresiva: la edad, la presencia de factores locales y la presencia de *A. actinomycetemcomitans*. El resultado de la interacción entre el estímulo microbiano, la respuesta inmuno-inflamatoria, el metabolismo del tejido óseo y del tejido conjuntivo, y varios factores de riesgo genéticos, ambientales y adquiridos, se pueden observar clínicamente. Los factores de riesgo adquiridos, incluyendo el estilo de vida y los patrones de comportamiento, varían de individuo a individuo y la patogenicidad de la placa bacteriana depende de los mismos, pudiendo ser observada clínicamente en los diferentes tipos de enfermedades periodontales [115].

En los últimos años, los hábitos tabáquicos también han sido objeto de múltiples estudios para demostrar su influencia negativa en la salud, de forma general, actuando como factor de riesgo en múltiples patologías de diferentes órganos y sistemas.

También en lo que respecta a enfermedades periodontales, la Academia Americana de Periodontología, en 1999, consideró el tabaco un factor de riesgo que afecta a la prevalencia y a la progresión de estas patologías (sobretudo periodontitis crónica, refractaria, agresiva generalizada, y gingivitis ulcero-necrótica aguda).

Los estudios revelan que los grupos de individuos con hábitos tabáquicos presentan mayor pérdida de hueso alveolar y de número de dientes, así como un menor índice de sangrado [116] [117] [118] [119].

Bergström *et al.*, [120], publicaron un estudio llevado a cabo en 235 individuos con patología periodontal, concluyendo que la pérdida ósea está asociada directamente con el hábito del tabaco. El 80% de individuos fumadores presentaba pérdida ósea en los estudios radiológicos.

Haffajee y Socransky, a propósito de un estudio realizado en 2001, [121], a partir de 298 individuos adultos con periodontitis, concluyeron que los fumadores presentaban una mayor media de adherencia conjuntiva, mayor profundidad de bolsas, mayor pérdida de piezas dentarias, menor sangrado al realizar el sondeo, y porcentajes semejantes de placa bacteriana e inflamación de encías, en comparación con los que nunca habían fumado.

Otros investigadores estudiaron la relación entre los hábitos tabáquicos y la presencia específica de algunas especies bacterianas. Preber *et al.*, [122], a partir de una muestra de 145 individuos (82 fumadores), estudiaron la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, y *P. intermedia*, en bolsas con profundidad igual o superior a 6mm, y compararon los resultados entre fumadores y no fumadores. En este estudio no se demostraron diferencias entre ambos grupos en relación a la presencia-ausencia de las bacterias referidas. Bostrom *et al.*, [123], concluyeron lo mismo a partir de 33 individuos fumadores y 31 no fumadores con patología periodontal moderada y severa.

Resumiendo, las evidencias sugieren que los hábitos tabáquicos disminuyen el sangrado gingival, probablemente por alteraciones de pequeños y grandes vasos sanguíneos locales. La pérdida de hueso alveolar y de adherencia del epitelio conjuntivo es mayor

en los fumadores. No está tan claro, por el contrario, que exista una mayor prevalencia de bacterias específicas principales causantes de patologías periodontales en individuos fumadores [124].

Entre los diversos factores de riesgo biológicos o sistémicos relacionados con la patología periodontal, la diabetes mellitus es, sin duda, el más relevante. Parece haber una relación directa entre ésta y la periodontitis, sobretodo en lo que respecta a la pérdida de adherencia, lo que se traduce como una de las múltiples consecuencias de las alteraciones del metabolismo celular de la enfermedad [125] [126].

Según lo comentado, y de acuerdo con lo referido por Albandar *et al.*, [124], la presencia de la placa bacteriana, los hábitos tabáquicos y la diabetes mellitus, constituyen los principales factores de riesgo para el desarrollo de la patología periodontal.

Con la identificación de los diferentes factores de riesgo, el tratamiento de las patologías periodontales ha evolucionado en los últimos diez años. Así, anteriormente, la actitud terapéutica se concentraba en el control de la placa bacteriana, mientras que en la actualidad, el abordaje es multifactorial.

#### **2.4.3. Aspectos epidemiológicos**

La investigación epidemiológica en periodoncia debe aportar datos sobre la prevalencia de la enfermedad periodontal en distintas poblaciones, así como también de su gravedad; dilucidar aspectos relacionados con su etiología y los determinantes de su desarrollo (factores de riesgo), y aportar documentación sobre la eficacia de las medidas preventivas y terapéuticas dirigidas contra estas enfermedades en función de la población diana.

#### **2.4.4. Aspectos clínicos**

Aunque la placa bacteriana sea determinante en el desarrollo de las patologías periodontales, la forma de progresión y las características clínicas son influenciadas por

factores adquiridos o genéticos que pueden modificar la susceptibilidad para la infección [127].

El diagnóstico y la clasificación de las patologías periodontales están aún hoy basados casi exclusivamente en características clínicas [128] [129]. El diagnóstico clínico periodontal está basado en factores como: 1) presencia o ausencia de señales clínicas de inflamación (sangrado al sondaje); 2) profundidad de la bolsa periodontal; 3) extensión y tipo de pérdida de adherencia de hueso alveolar; 4) historial del paciente; y 5) presencia-ausencia de algunos signos y síntomas como dolor, ulceración y presencia de placa y cálculo [130] [131] [132].

La patología periodontal inducida por placa está dividida en dos categorías generales basadas en la pérdida de adherencia: gingivitis y periodontitis. La gingivitis es la inflamación sin pérdida de adherencia del tejido conjuntivo, mientras que en la periodontitis además de inflamación gingival existe pérdida de adherencia del tejido conjuntivo y pérdida del hueso alveolar [128].

#### **2.4.5. Diagnóstico clínico**

##### **2.4.5.1. Periodonto clínicamente sano**

Según Schroeder *et al.*, [133], presenta una serie de mecanismos de defensa que operan en los tejidos gingivales, exhibiendo un pequeño infiltrado de células en la porción coronaria del tejido conjuntivo. Pero el diagnóstico de un periodonto clínicamente sano, es el resultado de la observación clínica de la encía, con ausencia de signos y síntomas patológicos.

##### **2.4.5.2. Gingivitis**

Se observan clínicamente alteraciones de las características de la encía sana, en el color, la textura y la posición anatómica. El estado clínico varía conforme al grado de inflamación (por eso es importante cuantificarlo mediante la tendencia al sangrado en el sondaje).

#### 2.4.5.3. Periodontitis

La enfermedad periodontal o periodontitis debe considerarse un proceso infeccioso que puede ser crónico o agudo. En principio puede afirmarse que se trata de una infección polibacteriana en la que están implicados diversos microorganismos. Ciertas bacterias o géneros bacterianos se han asociado más directamente con la enfermedad periodontal: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*.

#### 2.5. Microbiología de las enfermedades periodontales

La patología periodontal comprende un grupo de alteraciones inflamatorias de los tejidos de soporte de los dientes causadas por bacterias. Su forma clínica viene determinada por la respuesta del huésped frente al estímulo bacteriano.

La mayoría de las patologías orales son causadas por microorganismos o complicadas por éstos. Colonizan todos los tejidos de la cavidad oral, mineralizados o no. La colonización bacteriana de superficies dentarias forma la tradicionalmente conocida placa bacteriana.

##### 2.5.1. Placa bacteriana

Se forma en una secuencia de eventos ordenados y previsibles que se inician con la deposición de la película adquirida, seguida por la colonización primaria por parte de algunos microorganismos, colonización secundaria por otros que interaccionan con los primeros, entrando finalmente en una última etapa de maduración de la comunidad bacteriana que la forma [134].

##### 2.5.2. Principales microorganismos implicados en las enfermedades periodontales

Durante más de 100 años, los microbiólogos han buscado los agentes etiológicos de las patologías periodontales. Estudios realizados por diferentes autores, utilizando predominantemente técnicas de cultivo y microscopía, permitieron identificar un grupo de bacterias clave en la enfermedad periodontal destructiva. Estos trabajos compararon las microfloras de localizaciones sanas con otras que mostraban síntomas de



periodontitis, lesiones progresivas activas y no progresivas, así como otras de zonas tratadas. Tres especies, *B. forsythus*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* están estrechamente relacionadas con la enfermedad periodontal, progresión de la enfermedad e incluso fracaso terapéutico [135]. Así, estas especies fueron designadas como patógenas periodontales en el World Workshop in Periodontology realizado en Landsdowe, Virginia (Consensos Report, 1996).

### 2.5.3. Papel de *A. actinomycetemcomitans* en las enfermedades periodontales

El conocimiento del papel de *A. actinomycetemcomitans* en la enfermedad periodontal proviene de diversos estudios iniciales de la flora subgingival y de su detección en una de las formas clínicas de periodontitis, la periodontitis juvenil localizada (actualmente periodontitis agresiva localizada). Estudios realizados en Copenhague y Boston por Slots, en 1976, [136] y Newman, en 1977, [137], demostraron que la flora encontrada en muestras de pacientes con periodontitis juvenil localizada, era muy diferente a la encontrada a partir de otras zonas sanas de los mismos pacientes.

*A. actinomycetemcomitans* desempeña un papel muy importante como patógeno en formas severas y reincidentes de periodontitis. La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en la periodontitis juvenil localizada es casi del 90% y de entre 30-50% en periodontitis agresiva generalizada [138].

Entre los cinco serotipos actualmente reconocidos como estirpes, el serotipo *b* es el predominante en muestras de individuos con periodontitis juvenil localizada [33].

Conjuntamente con *A. actinomycetemcomitans*, que se aísla en grandes cantidades en pacientes con periodontitis juvenil localizada, también se encuentran en las muestras obtenidas en dicha patología pero en menor cantidad, otras especies como: *Capnocytophaga spp*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* y *B. capillus* [139].

La periodontitis juvenil localizada, es una lesión periodontal que provoca en individuos adolescentes, la destrucción del tejido periodontal en un corto espacio de tiempo [140]. Clínicamente se traduce en una pérdida de inserción de 4 mm o más, afectando principalmente los primeros molares e incisivos y con una distribución generalmente simétrica en las arcadas dentarias [141]. La dolencia afecta al 0.1-2.3% de los jóvenes y adolescentes, con mayor prevalencia en la étnia negra [33]. Presenta predisposición

famíliar, con una probabilidad de desarrollo de la enfermedad del 50% si existen precedentes familiares.

Zambon *et al.*, [33] y Slots *et al.*, [142], demostraron que *A. actinomycetemcomitans* era el principal agente causal de la enfermedad basándose en evidencias microbiológicas, clínicas e inmunológicas. Entre ellas destaca:

- 1) Presencia de gran cantidad de *A. actinomycetemcomitans* en aislamientos procedentes de pacientes afectados teniendo en cuenta que su presencia en pacientes sanos es baja.
- 2) Relación entre la erradicación local de *A. actinomycetemcomitans* y la recuperación progresiva de los tejidos con mejoría de los síntomas clínicos.
- 3) Presencia de un gran número de *A. actinomycetemcomitans* en las bolsas periodontales relacionada con una respuesta inmune humoral significativa.
- 4) Capacidad de liberación de factores de virulencia implicados en la patología de la dolencia.

En la periodontitis de evolución rápida (actualmente periodontitis agresiva generalizada), *A. actinomycetemcomitans* se aísla conjuntamente con otras bacterias como *P. gingivalis*, *B. capillus*, *P. intermedia*, *E. corrodens* y *C. rectus* [59] [142] asociándose a otras lesiones activas refractarias a tratamientos estándar [143] [142]. La periodontitis de evolución rápida se traduce en una pérdida severa generalizada de hueso alveolar con una mayor prevalencia en adultos jóvenes.

*A. actinomycetemcomitans* produce lesiones tisulares del tejido periodontal por distintos mecanismos. Recientemente se ha demostrado que algunos periodontopatógenos entre los que se encuentra, estimulan la producción de metaloproteinasas (MMPs), inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs), y activadores del plasminógeno por los fibroblastos gingivales. Además, *A. actinomycetemcomitans* activa cambios en la expresión y en el grado de fosforilación de las proteínas de señal de los fibroblastos. Se ha demostrado además que el lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* induce la formación por los fibroblastos de un activador del plasminógeno de 50 kDa, de MMP-2 y, en menor grado de MMP-3. En definitiva la estimulación de los fibroblastos por *A. actinomycetemcomitans* contribuye por diversos mecanismos inmunitarios a la destrucción del tejido periodontal [144].

La adherencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a las células epiteliales constituye una fase fundamental de la patogénesis de la periodontitis agresiva juvenil localizada. Publicaciones de los últimos años han mostrado además la presencia de secuencias víricas en las bolsas periodontales, describiéndose incluso aislamientos víricos. El virus más frecuentemente encontrado es el Citomegalovirus humano. En general se acepta que la presencia activa de virus, modifica, entre otras propiedades, las de adherencia de las células infectadas (transformación vírica). Se supone que la infección vírica modifica las propiedades superficiales ya que en todas las cepas de la especie ensayadas el incremento de la adherencia de *A. actinomycetemcomitans* es concomitante con la infección vírica [145].

#### 2.5.4. El fenómeno de la capacidad de disociación colonial

Los cambios en la concentración ambiental de oxígeno son comunes en los biofilms. Las comunidades de bacterias sésiles compuestas de agregados de bacterias embebidas en una matriz extracelular están formadas por organismos que acceden de forma muy distinta al aire según el lugar en el que estén situados y la cantidad y calidad de la matriz extracelular.

La formación de variantes coloniales durante la formación del biofilm ha sido descrita en muchas especies incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. Diferentes autores [146] [147], describen la aparición de pequeñas colonias (small colony variant (SCV)) durante el desarrollo de biofilm de *P. aeruginosa*. Estos organismos muestran exacerbación de las propiedades de adherencia, aceleración en la formación de biofilm, y mayor facilidad para separarse del propio biofilm. Otros autores [148] descubrieron dos variantes denominadas “mini” y “arrugada” que aparecían espontáneamente en los biofilms en elevadas proporciones. Las variantes arrugadas tienen tasas de liberación del biofilm mucho menores, mientras que tienen aumentada la eficiencia de incorporación al biofilm. Por el contrario las variantes mini presentan un fenotipo caracterizado por liberarse del biofilm con mucha facilidad (*hiperdetaching*) por medio de un mecanismo que incluye un tensioactivo.

Cabe también señalar que las colonias de algunos organismos muestran ciertas ventajas selectivas para la vida en biofilm, particularmente cuando expresan fenotipos que se

han demostrado relacionados con el biofilm, tales como hiperadherencia, autoagregación, hidrofobicidad incrementada, reducción en la capacidad de movimiento “natatorio” y movilidad “espasmódica” (twitching) [149].

Se ha descrito también el aislamiento de variantes coloniales en bacterias Grampositivas. Waite *et al.*, [150], demostraron que *Streptococcus pneumoniae* serotipo 3 formaba biofilms con gran frecuencia de variación de fase lo que se atribuyó a la tasa de duplicación al azar del gen *cps3D*. Cuando este organismo crece en biofilm produce colonias que difieren en tamaño (grandes, medianas y pequeñas) y mucosidad en agar sangre. Las variantes pequeñas y no-mucoides (SCV) aparecen en las etapas iniciales de adhesión de la formación del biofilm de *S. pneumoniae* y son dominantes durante el proceso de formación del mismo. Las variantes mucoides aparecen en fases más avanzadas. La reducción en el tamaño colonial y en la mucosidad se correlaciona con un descenso en la producción de cápsula y en un incremento de la adhesión. Las colonias grandes y mucoides forman biofilms planos y desestructurados, no pueden autoagregarse en líquido y se adhieren pobremente a las superficies sólidas, por el contrario las SCV se autoagregan en cultivo líquido, son hiperadhesivas a superficies sólidas y a biofilms formados con estructura tridimensional aparente formando microcolonias.

Las distintas variantes muestran sensibilidad similar a los antibióticos cuando crecen en biofilms, sin embargo el tratamiento con antibióticos de *S. pneumoniae* altera las proporciones de variantes afectando principalmente las zonas más interiores del biofilm. No se han publicado descripciones similares en *A. actinomycetemcomitans*

## 2.6. Terapia de las enfermedades periodontales

El tratamiento de la enfermedad periodontal, que tiene como objetivos reducir o eliminar la placa supragingival y subgingival, así como reducir o eliminar la profundidad de la bolsa y mantener razonablemente inalterados el hueso y los niveles de adherencia [151] [152] puede llevarse a cabo utilizando técnicas quirúrgicas o no.

### **2.6.1. Higiene oral**

Si la higiene oral es deficiente, el crecimiento de la placa bacteriana alcanza su cénit a los 3-4 días del inicio de su formación, y será detectada en casi todas las superficies [153].

Son varios los trabajos que demuestran la conveniencia del uso de las técnicas de cepillado asociadas a un medio auxiliar como la utilización de hilo dental en la eliminación mecánica de la placa bacteriana [154] [155] [156].

La búsqueda y desarrollo de productos para el control químico de la placa bacteriana constituye una alternativa al tratamiento mecánico con el fin de conseguir su adecuada eliminación.

### **2.6.2. Terapia mecánica convencional**

La terapia periodontal depende de un adecuado tratamiento mecánico por raspado y alisamiento de las superficies radiculares para la eliminación de cálculo y los microorganismos patógenos así como para la prevención de su recolonización.

### **2.6.3. Raspado y alisado subgingival**

El tratamiento mecánico subgingival (raspado y alisado radicular, que puede o no combinarse con técnicas quirúrgicas), constituye la base de la terapia periodontal. Los patógenos periodontales varían en cuanto a su susceptibilidad al tratamiento mecánico. Algunos de ellos se localizan en áreas fuera del alcance de los instrumentos periodontales y no pueden ser eliminados.

### **2.6.4. Cirugía periodontal**

La terapia periodontal basada en técnicas quirúrgicas, es considerada por muchos autores como una terapia complementaria a la convencional ya que la eficacia de los raspados y alisados radiculares mecánicos disminuye cuando se tratan bolsas periodontales muy profundas. Esta profundidad desempeña un papel muy importante en la ecología subgingival. Es más frecuente que se den condiciones anaeróbicas en bolsas periodontales profundas, que favorecen la colonización por parte de microorganismos

anaeróbicos potencialmente patógenos. Como consecuencia de ello, uno de los objetivos de la cirugía periodontal es alterar el ambiente subgingival mediante la reducción quirúrgica de la profundidad de la bolsa.

#### 2.6.5. El uso de los antibióticos en la práctica dental

Desde el inicio de la era antibiótica con el descubrimiento de la penicilina, la capacidad de los dentistas para tratar infecciones orales se ha modificado por completo, pero a su vez, la resistencia bacteriana ligada a diferentes mecanismos ha incrementado considerablemente. Debido al actual uso masivo de los antibióticos en odontología, es de vital importancia que éste sea acertado y esté prescrito de forma responsable.

En principio, para conseguir una terapia oral óptima, el antibiótico debería absorberse completamente, difundir a través del tejido y presentar concentraciones locales adecuadas en la zona afectada. Además, debería permanecer activo el mayor tiempo posible a baja concentración. También sería recomendable la utilización de antibióticos específicos para los microorganismos que sea necesario combatir, y que fueran administrados en dosis adecuadas que permitieran una acción local óptima. Una terapia inadecuada no solamente fracasa en la eliminación de la infección sino que además, y como ya ha sido ampliamente demostrado por diversos autores, favorece el desarrollo de resistencias [157]. Por ello, para alcanzar una terapia con éxito, es imprescindible conocer la etiología de la enfermedad aislando los agentes implicados.

Según Ashkenazi *et al.*, [158], las infecciones orales pueden dividirse en dos grupos según su origen: infecciones odontogénicas (abscesos dento-alveolares) que se originan desde la pulpa dental y que están comúnmente causadas por microorganismos anaerobios Gram-positivos o bacterias facultativas. En estos casos, el autor propone la administración de antibióticos vía sistémica acompañada de drenaje del absceso, desbridamiento del canal radicular del diente afectado, y administración local de medicación antimicrobiana como hidróxido cálcico, penicilina G o amoxicilina. En pacientes alérgicos a la penicilina, se recomienda el uso de clindamicina antes que de macrólidos.

El segundo grupo de infecciones, originadas en el periodonto, están causadas por bacilos Gram-negativos anaerobios frecuentemente acompañados por *A.*

*actinomycescomitans*. Los antibióticos sistémicos no están indicados para estas situaciones, pero tampoco hay un consenso generalizado para la terapia antibiótica más adecuada en este caso.

Por otra parte, el empleo de antibióticos para combatir la enfermedad periodontal presenta dos dificultades que hay que considerar con especial atención. Por un lado es preciso que los agentes antimicrobianos empleados, se acumulen o se encuentren en la zona de la afección a concentraciones como mínimo ligeramente más elevadas que la concentración mínima inhibitoria (*MIC*) que presente *in vitro* el microorganismo para el antimicrobiano en cuestión. Ello implica como mínimo que la presencia activa del antimicrobiano en la saliva y el fluido crevicular sea suficiente como para que se alcancen esas concentraciones.

Pero aún hay más, las bacterias se encuentran formando parte de la denominada por los clínicos placa subgingival. Se trata en términos microbiológicos de un biofilm pluriespecífico que integra diversas bacterias. Las bacterias que se desarrollan y sobreviven en un biofilm se comportan, por lo que respecta a su susceptibilidad a los antibióticos, de modo muy distinto a las bacterias planctónicas. Se ha determinado que su susceptibilidad puede reducirse en varios órdenes de magnitud con respecto a las bacterias planctónicas. Por ello la posibilidad de que se alcancen las *MIC* deseadas disminuye.

#### **2.6.6. Los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales**

Las dos últimas décadas del siglo XIX fueron consideradas la era dorada de la bacteriología médica, cuando fueron aislados e identificados mayoritariamente los microorganismos responsables de las infecciones bacterianas.

El uso racional de antibióticos para el tratamiento de enfermedades periodontales debe basarse en el conocimiento de la microflora patógena. A partir de ahí, múltiples antibióticos y agentes antimicrobianos han sido utilizados, tanto por su eficacia preventiva como para el tratamiento de patologías periodontales bien establecidas [159] [160].

Según la Academia Americana de Periodontología, en el tratamiento de enfermedades periodontales, los antibióticos deben ser considerados como coadyuvantes del

tratamiento mecánico convencional. El uso de antibióticos potentes presupone un adecuado diagnóstico clínico, completo tratamiento mecánico y análisis microbiológico cuando esté indicado. El siguiente programa representa una aproximación práctica a la terapia antibiótica:

1. Terapia mecánica inicial que debe incluir raspado y alisado de la superficie radicular con acceso quirúrgico si es necesario.
2. Si es necesario puede haber prescripción antibiótica basada en los resultados de los tests microbiológicos.
3. La respuesta clínica debe ser evaluada 1-3 meses después de haber sido completada la terapia mecánica periodontal. Si la lesión progresa o si la inflamación no está resuelta, el examen microbiológico de la flora subgingival puede ayudar a determinar y cuantificar la presencia de posibles patógenos periodontales.
4. Tras la terapia antimicrobiana específica según los resultados microbiológicos, de 1-3 meses después puede ser necesario otro cultivo microbiológico para verificar la eliminación de la tasa de patógenos y ver si existen otros microorganismos. Niveles altos de *Streptococcus mitis*, *Actinomyces spp.* y *Veillonella spp.*, serán sugestivos de salud periodontal o patología mínima.
5. Una vez resuelta la infección periodontal, el paciente debe ser mantenido en un programa de control de placa supragingival para ayudar a prevenir la recolonización por patógenos periodontales. La recurrencia de la enfermedad progresiva requiere la repetición de las pruebas microbiológicas y subsiguiente terapia antibiótica dirigida específicamente contra los microorganismos patógenos.

Este programa nos indica que la utilización de agentes antimicrobianos sistémicos locales es un complemento al tratamiento mecánico de las enfermedades periodontales. La eficacia de un antibiótico como coadyuvante en el tratamiento periodontal depende no sólo de que esté presente localmente a concentraciones adecuadas sino que de alguna manera se mantenga activo el tiempo suficiente para actuar.



Determinar la concentración ideal que ha de alcanzar un determinado antibiótico en la bolsa periodontal es un gran desafío, considerando que las bacterias están por lo general asociadas formando biofilms más o menos estables. Se estima que la concentración ideal sería como mínimo 50 veces mayor de lo que determinan los test *in vitro* [161].

De entre la gran variedad de agentes antimicrobianos existentes, sólo un número limitado de ellos ha sido elegido para una posible utilización en terapia periodontal. Pueden ser aplicados localmente en la bolsa periodontal, o vía sistémica. Cada método de aplicación o vía de administración presenta ventajas e inconvenientes específicos.

#### 2.6.7. Terapia antimicrobiana sistémica

En la mayoría de las periodontitis no es posible establecer con total seguridad cuáles son los microorganismos implicados incluso después de un examen clínico exhaustivo, pero a pesar de ello parece que los antibióticos más utilizados por vía sistémica son tetraciclina, doxiciclina, eritromicina, clindamicina, amoxicilina y metronidazol.

Debido a que el aumento de los niveles de resistencia bacterianos a los antibióticos es un problema creciente en el ámbito clínico, es muy recomendable que la prescripción sistémica de antibióticos en periodontología esté basada en datos científicos que incluyan la determinación de la concentración mínima inhibitoria (*MIC*) para los antibióticos de elección en clínica, especialmente en pacientes que no responden al tratamiento mecánico convencional

Pero en contraste a lo anterior, la selección, la dosis y el uso en general de muchos agentes antimicrobianos, han sido aplicados empíricamente de forma incorrecta. Muchos de estos agentes se han demostrado efectivos frente a infecciones bacterianas agudas de otras localizaciones, pero existen dificultades para demostrar una respuesta similar eficaz en el tratamiento de la patología periodontal.

Generalmente, en pacientes con periodontitis de adulto, el uso de terapia antibiótica administrada vía sistémica no parece ofrecer una mejoría a largo plazo. En contraste, los efectos beneficiosos de la terapia antibiótica sistémica para combatir la periodontitis agresiva son, probablemente, debidos a la eliminación de patógenos periodontales específicos. La presencia de *A. actinomycetemcomitans*, presente en este grupo de

infecciones periodontales, disminuye significativamente si al tratamiento periodontal convencional se le asocia una terapia sistémica con tetraciclina. Con todo, incluso después de algunas semanas de tratamiento antibiótico, *A. actinomycetemcomitans* puede continuar aislándose a partir de algunas localizaciones específicas. Todavía hoy no está claro si el fracaso terapéutico se debe a incumplimiento por parte del paciente, dificultad de conseguir una concentración de antibiótico adecuada localmente o es debido a factores de virulencia de la propia bacteria.

Diferentes autores desde hace algunos años han estudiado el perfil de susceptibilidad de *Actinobacillus actinomycetemcomitans in vitro* obteniendo resultados incluso contradictorios. Por ejemplo, Slots *et al.*, [162], ya estudiaron el perfil de susceptibilidad de 57 cepas clínicas y 2 no clínicas mediante la técnica de dilución en agar, concluyendo que la tetraciclina y la minociclina eran de entre todos los antibióticos ensayados, los más adecuados para el tratamiento de infecciones provocadas por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Observaron además que alrededor del 10% de cepas eran a la vez resistentes a ampicilina, eritromicina y penicilina G a concentraciones de 32-64 µg/ml.

En 1999, en un trabajo semejante, Madinier *et al.*, [98], estudiaron el perfil de susceptibilidad de 50 cepas clínicas de *A. actinomycetemcomitans* mediante el método de dilución en caldo, demostrando susceptibilidad a amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, pristamicina, ciprofloxacina, tetraciclina y eritromicina. El 40% de las cepas ensayadas eran sensiblemente resistentes a penicilina G no encontrando β-lactamasas en ninguna cepa. Concluyeron que los antibióticos más adecuados frente a *A. actinomycetemcomitans in vitro* eran por este orden amoxicilina, tetraciclina y eritromicina.

Como norma general, parecía consensuada por diferentes autores [163] [164] [165], la susceptibilidad *in vitro* de *A. actinomycetemcomitans* frente a tetraciclina, pero en 1995, Roe *et al.*, [166], caracterizaron el determinante TetB asociado con plásmidos conjugativos y responsable de la resistencia a la tetraciclina, observada en el 45% de las cepas estudiadas. Observaron que el 82% de las cepas hibridaban con la sonda de TetB y que se podría transferir entre *A. actinomycetemcomitans* y *H. influenzae*, reproduciéndose el fenotipo resistente.

Se ha demostrado ampliamente que el estricto tratamiento quirúrgico fracasa frecuentemente cuando se trata de afecciones periodontales en las que está implicado *A. actinomycetemcomitans* [167] [168] [169]. Cuando el tratamiento mecánico de la enfermedad periodontal resulta insuficiente hay que recurrir a la quimioterapia antimicrobiana.

Se ha postulado que la única forma de intentar (con relativas opciones de éxito) eliminar los microorganismos de la placa subgingival es la utilización de antibióticos por vía sistémica [170]. De acuerdo a distintos protocolos de tratamiento, se acostumbra a utilizar diversos antibióticos cuyos mecanismos de acción son variados.

#### **2.6.8. Terapia antimicrobiana local**

La instrumentación subgingival no es igualmente efectiva para la eliminación de todas las especies bacterianas. Así, parece lógico que la aplicación local de agentes antimicrobianos pueda ayudar a eliminar dichos patógenos periodontales, aumentando el beneficio clínico de la terapia mecánica.

Los sistemas de distribución local del fármaco (que van desde la simple irrigación de la bolsa periodontal, colocación de geles, a dispositivos sofisticados que van liberando de forma continua los agentes antimicrobianos), han de ser aplicados directamente en el área dañada, incluyendo la base de la bolsa periodontal, y han de suministrar una concentración de antibiótico adecuada y estable a lo largo del tiempo.

Todavía no hay demasiada información acerca del riesgo de crecimiento de levaduras u otros patógenos oportunistas después de la terapia medicamentosa local.

#### **2.7. La resistencia bacteriana a los antibióticos en las enfermedades periodontales**

El descubrimiento de los antibióticos y su posterior introducción en el tratamiento de enfermedades en la década de los años cuarenta ha sido uno de los grandes avances del s. XX. Hoy, muchos antibióticos que inicialmente eran eficaces para el tratamiento de determinadas enfermedades, ya no lo son o tienen que ser administrados a dosis más elevadas. Esto es especialmente grave en algunos países como España y Portugal, donde se ha demostrado la mayor incidencia de bacterias resistentes y multiresistentes [171].

Diversos autores han demostrado que el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos aumenta el riesgo de provocar la aparición de cepas bacterianas resistentes [172] [173]. Además, la resistencia de las bacterias que crecen inmersas en los biofilms puede llegar a ser de 1000 a 1500 veces mayor respecto a la encontrada en las bacterias planctónicas [174].

## 2.8 Bombas de reflujo

Todas las células, tanto eucariotas como procariotas, presentan sistemas de transporte de membranas involucrados en la captación de nutrientes, excreción de productos tóxicos y mantenimiento de la homeostasis. Con técnicas de clonación y secuenciación se han identificado diferentes familias de transportadores entre los que destacan las bombas de reflujo que bombean al exterior de la célula gran variedad de sustancias (en principio nocivas) disminuyendo su concentración intracelular. Las bacterias pueden adquirir resistencia a un elevado número de antimicrobianos a través de la actividad de dichas bombas de extrusión. La organización de los sistemas de reflujo obviamente debe ser diferente en bacterias Gram positivas y Gram negativas debido principalmente a sus diferencias estructurales, siendo más simples y con un único componente situado en membrana citoplasmática en las bacterias Gram positivas. Según criterios estructurales y bioenergéticos, los transportadores de resistencia a múltiples antibióticos se pueden dividir en dos grupos: los transportadores secundarios de múltiples antibióticos (*SMT*) con intercambio protónico y los transportadores *ABC* (*ATP Binding Cassettes Multidrug Transporters*). Recientemente se ha descrito en bacterias Gram negativas una nueva familia de transportadores denominada *MATE* (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*) que utiliza un gradiente electroquímico de iones  $\text{Na}^+$  para la obtención de energía. Los *SMT* están involucrados en el transporte de azúcares, aniones y antibióticos denominándose también antiportadores de protones. Como se muestra en la figura 2.8, pueden dividirse en diferentes familias de proteínas agrupadas según medida y estructuras primaria y secundaria: *MFS* (*Major Facilitator Family*), *SMR* (*Small Multidrug Resistance*) *RND* (*Resistance Nodulation Cell Division*) Los transportadores más comunes en bacterias Gram negativas son los de la familia *RND*, con una estructura típica con tres elementos: el transportador en membrana interna, el canal de membrana externa *OMF* (*Outer Membrane Factor*) y la proteína de fusión

periplasmática *MFP* (*Membrane Fusion Protein*), cuyo ejemplo mejor estudiado lo constituye la bomba *acrAB-TolC* de *E.coli* ampliamente caracterizada.

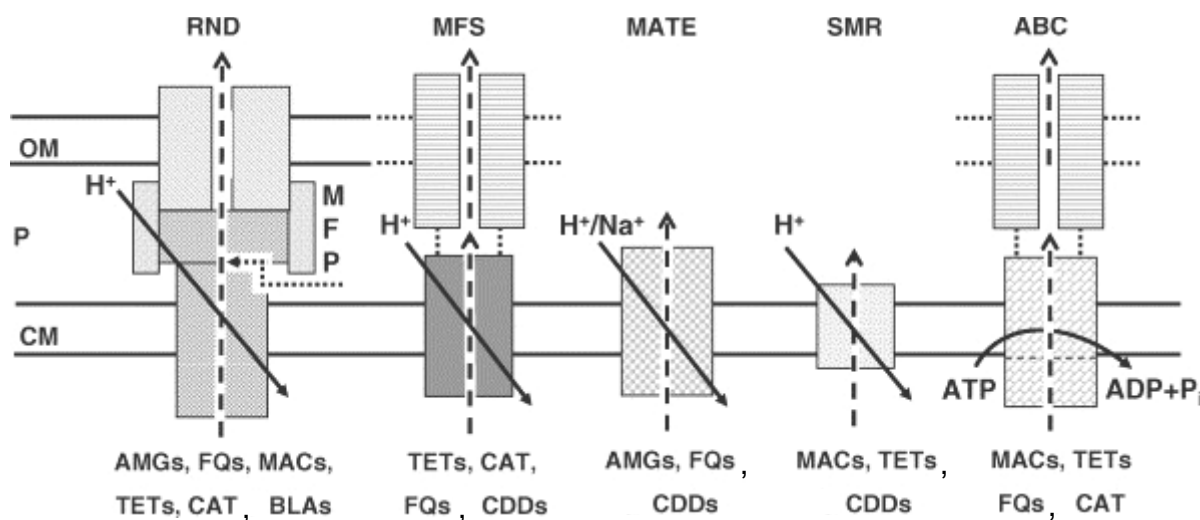


Figura 2.8 Tipos de transportadores de resistencia.

## 2.9 Integrones

Los integrones son elementos génicos potencialmente móviles, capaces de integrar y expresar de forma mayoritaria aunque no exclusiva genes de resistencia a los antibióticos. Mediante un mecanismo de recombinación específico incorporan genes denominados *cassettes*, de carácter móvil y con una estructura particular (*attC*) que confieren resistencia a los antimicrobianos. Generalmente se localizan en plásmidos conjugativos aunque también se pueden encontrar en el cromosoma. En su estructura presentan tres zonas diferenciadas: dos regiones conservadas en los extremos (5'-CS y 3'-CS) y una región central de composición y tamaño variable.

Los componentes esenciales de un integrón, (figura 2.9) situados todos ellos en el extremo 5' incluyen el gen *int I* que codifica una integrasa, la secuencia *attI* o lugar de recombinación específico y los promotores *Pant* encargados de promover la expresión de cualquier gen casete integrado.

Se han descrito diversas familias de integrones según la homología de la integrasa. Los integrones de clase 1, 2 y 3 están relacionados con la expresión de genes de resistencia y

sus integrasas presentan entre un 43-58% de identidad de aminoácidos, sugiriendo una divergencia evolutiva por un periodo superior a 50 años que se correspondería aproximadamente con el inicio de la era antibiótica. Los integrones de clase 1 son los más frecuentes en las cepas aisladas de casos clínicos.

La mayoría de los integrones de clase 1 también presentan una secuencia 3' conservada que contiene un gen que confiere resistencia a componentes de amonio cuaternario (*qacEΔ*) y un gen de resistencia a sulfonamidas (*sulI*), estos dos genes no son *cassettes* si no que se hallan fijos en el integrón.

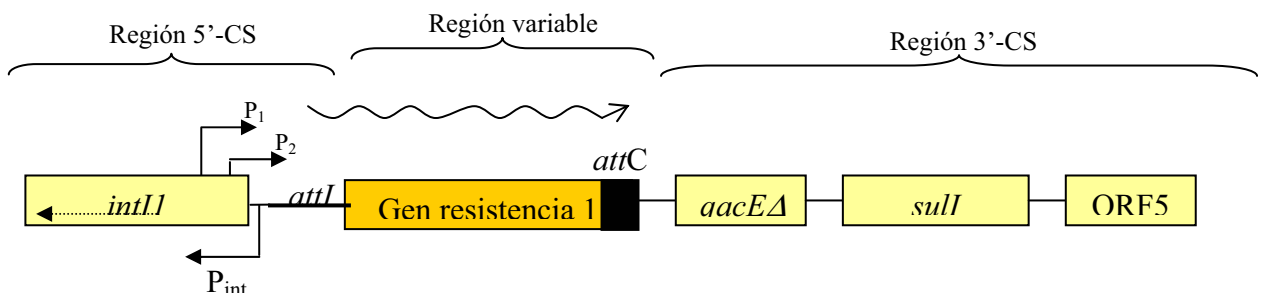


Figura 2.9. Estructura general de los integrones.

El dinamismo de los integrones se debe a la capacidad de los cassettes de escindirse en forma de círculos autónomos no replicativos y posteriormente integrarse en un nuevo integrón. Estos cassettes constituyen un grupo de pequeños elementos móviles que tienen una sola pauta de lectura abierta completa (*orf*) y una región codificante presentando en posición 3' una secuencia de recombinación específica para la integrasa conocida como *attC* o elemento de 59 bases. La secuencia más frecuente en los extremos de los lugares *attC* es CTAAC--- (60-110pb) ---GTTAG. Los cassettes son movilizados por la integrasa que reconoce el lugar *attC* del cassette y el lugar receptor *attI* del integrón permitiendo tanto su integración como su escisión. Aunque se consideran elementos móviles, los cassettes no codifican productos involucrados en su propia movilidad.

Los integrones juegan un papel muy relevante en la diseminación de resistencias a los antibióticos en bacterias Gram negativas. La diseminación de los genes de resistencia aumenta cuando forman parte de cassettes móviles al facilitarse su transferencia

horizontal. Si los integrones forman parte de un transposón pueden transponerse desde el cromosoma al plásmido o viceversa. Además si estos plásmidos son conjugativos pueden transferirse a bacterias de la misma especie o entre especies, siendo un importante fenómeno genético debido a la presión selectiva existente a nivel nosocomial

## 2.10 Las proteínas de la membrana externa

Las proteínas de la membrana externa son esenciales para la captación de moléculas hidrofílicas del exterior (por ejemplo nutrientes) en las bacterias Gram negativas. Se trata de proteínas que, como muestra la figura 2.10, forman canales transmembrana (*barrel channel*), siendo características de las bacterias Gram negativas, las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias Gram positivas muy hidrofóbicas.

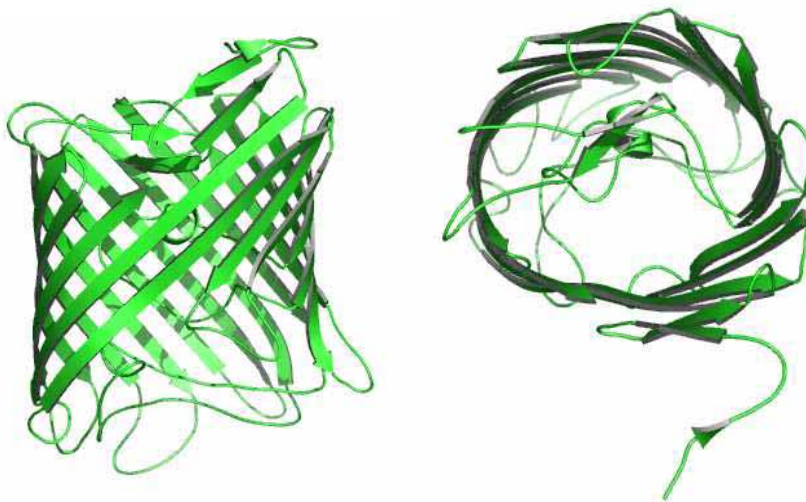


Figura 2.10. Los poros transmembrana producidos por estas proteínas están formados por 16 cadenas anfipáticas antiparalelas situadas en forma de barril.

Muchas de estas proteínas (porinas) son inespecíficas o moderadamente específicas. El número total de porinas presentes en una membrana externa es más o menos constante pero la proporción entre ellas varía dependiendo de las condiciones ambientales. Se ha demostrado que mutaciones que afecten a las porinas pueden resultar en la emergencia de susceptibilidades disminuidas o incluso en resistencia a los antibióticos.

### ***3. OBJETIVOS***

---





### 3. OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar los mecanismos que conducen a sensibilidades disminuidas de *A actinomycetemcomitans* a los antibióticos. Este objetivo de carácter general se ha dividido en dos objetivos diferenciados:

- 1.- Averiguar los casos en los que se da una sensibilidad disminuida y el mecanismo (o mecanismos) que la determinan.
2. Averiguar la eventual presencia de información genética y/o estructuras que puedan en el futuro inducir la emergencia de sensibilidades disminuidas en la bacteria.



## ***4. MATERIALES Y MÉTODOS***

---



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas

Se trabajó con una población de 14 cepas de *A. actinomycetemcomitans*. Según se indica en la tabla 4.1.a, doce de ellas eran de origen clínico, recogidas a partir de pacientes que presentaban diversas dolencias periodontales y otras 2 eran cepas de colección, cedidas por el Instituto *Pasteur* de París.

| DENOMINACIÓN | ORIGEN                              |
|--------------|-------------------------------------|
| AC 01        | Periodontitis agresiva generalizada |
| AC 02        | Periodontitis crónica. generalizada |
| AC 03        | Gingivitis                          |
| AC 04        | Gingivitis                          |
| AC 05        | Periodontitis agresiva localizada   |
| AC 06        | Gingivitis                          |
| AC 07        | Periodontitis crónica generalizada  |
| LP 08        | <i>Cepa de colección</i>            |
| AC 09        | Periodontitis agresiva generalizada |
| AC 10        | Periodontitis crónica generalizada  |
| AC 11        | Periodontitis agresiva generalizada |
| AC 12        | Periodontitis crónica generalizada. |
| LP 13        | <i>Cepa de colección</i>            |
| AC 14        | Periodontitis crónica generalizada  |

Tabla 4.1.a. Origen de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* utilizadas.

También se utilizaron otras cepas de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros bacterianos, que por sus características moleculares se usaron como controles positivos o negativos en experimentos de amplificación de diversos genes. Se detallan a continuación (tabla 4.1.b).

| MICROORGANISMO       | DENOMINACIÓN | GENOTIPO                       |
|----------------------|--------------|--------------------------------|
| <i>E.coli</i>        | AG100        | <i>acrAB</i> <sup>-</sup>      |
| <i>H. influenzae</i> | Rd 31517ATCC | <i>acrAB</i> <sup>+</sup>      |
| <i>P. aeruginosa</i> | P1           | Integrones claseI <sup>+</sup> |
| <i>E.coli</i>        |              | <i>pUC 19</i> <sup>+</sup>     |
| <i>M. morganii</i>   | HUB 198351   | plásmido resist. <sup>+</sup>  |

Tabla 4.1.b. Otros microorganismos empleados

## 4.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados durante todo el experimento fueron los siguientes:

### *VMGA III*

Utilizado para la recogida y transporte de muestras al laboratorio. Permite la conservación de microorganismos periodontales.

Composición en g/l:

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Triptona.....            | 0.5 g. |
| <i>Thiotone</i> .....    | 0.5 g. |
| Agar bacteriológico..... | 0.2 g  |
| Gelatina.....            | 50 g   |
| Cisteína.....            | 0.5 g  |

Se añadieron 0.5 ml de ácido tioglicólico, 100 ml de solución salina y agua destilada hasta un volumen final de 1litro. La solución se mezcló a 50°C, se hirvió durante 3 minutos ajustándose el pH a 7.2.

### *AGAR-BRUCELLA*

Utilizado para realizar los cultivos primarios de las muestras en el laboratorio.

Composición en g/l:

|                            |      |
|----------------------------|------|
| <i>Brucella Base</i> ..... | 45 g |
| Agar bacteriológico.....   | 3 g  |
| Extracto levadura.....     | 2 g  |

Se añadió sobre un volumen final de 1litro de agua destilada:

|                                   |
|-----------------------------------|
| 5% sangre desfibrinada de carnero |
| 0.2% sangre hemolizada de carnero |

0.0005% hemina

0.0005% menadiona

Se homogenizó la solución, hirviéndola a 100°C. Se esterilizó en el autoclave de vapor, atemperándose a 50°C y se le añadió la sangre, hemina y menadiona.

#### *TSBV AGAR*

Utilizado como medio selectivo apropiado para el aislamiento de *A. actinomycetemcomitans* en el laboratorio [34].

Composición en g/l:

*Trypticase soy agar*.....40 g

Extracto de levadura.....1 g

Bacitracina.....75 mg

Vancomicina.....5 mg

0.1% suero de caballo estéril.

Se homogenizó la solución hirviéndola a 100°C, se esterilizó en el autoclave de vapor, se atemperó a 50°C y se le añadieron los antibióticos y el suero.

#### *MEDIO TGY (Agar o caldo)*

Fue utilizado en sus dos formas (agar y caldo), [175], para la resiembra continua y el mantenimiento de *A. actinomycetemcomitans* durante el trabajo rutinario.

Composición en g/l:

*Trypticase soya agar*.....40 g ó

(*Trypticase soya broth*.....30 g)

Extracto de Levadura.....6 g

Glucosa.....8 g

#### *TGY II CON GLICEROL*

Para conservar las cepas se utilizó el siguiente medio de cultivo.

Composición en g/l

*Biotrypticase*.....30 g

Glucosa.....5 g

Extracto levadura.....20 g

HCl-Cisteína.....0.5g



Se realizaron diferentes cultivos en medio sólido de cada una de las cepas y se incubaron a 37 °C, con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Cuando se observó crecimiento suficiente, se recuperaron las colonias crecidas en las placas y se resuspendieron en 1 ml de medio de conservación. Las cepas se congelaron en criotubos inicialmente a -20°C durante treinta minutos y finalmente a -80 °C hasta su utilización.

Cuando las cepas se sembraron en medio TGY II, se les añadió glicerol estéril hasta una concentración final del 10 %.

### **4.3 Tratamiento de las muestras**

#### **4.3.1 Recogida de muestras**

La población objeto de estudio estaba formada por 57 pacientes atendidos en el servicio de periodontología de la clínica Odontológica Universitaria de la UB. Los exámenes clínicos fueron realizados según el protocolo clínico del Servicio de Periodontología. Antes de recoger las muestras, el clínico procedió a la eliminación de la placa supragingival. La toma de las muestras fue efectuada a partir de 4 surcos gingivales diferentes. En los pacientes sin periodontitis, el aislamiento se llevó a cabo en los primeros molares e incisivos centrales; en los pacientes con periodontitis, las muestras fueron recogidas de las bolsas periodontales, utilizando tiras de papel estéril que se pusieron en contacto con los surcos subgingivales lo más profundamente posible y se dejaron durante un período no inferior a 20 segundos.

#### **4.3.2. Procesamiento**

De inmediato las tiras de papel fueron depositadas en un vial con un medio de transporte específico para *A. actinomycetemcomitans*, VMGA III (*Viability Medium Göteborg Anaerobe*) [176]. Se trata de un medio de transporte recomendado también por Slots *et al.*, [34], para la conservación de microorganismos periodontales.

El transporte al laboratorio se realizó lo más rápidamente posible y los viales de medio de cultivo se calentaron levemente una vez en el laboratorio durante 10 minutos para fundir la gelatina. A continuación las muestras en el medio fueron homogeneizadas durante 45 segundos a velocidad máxima utilizando un agitador.

Se prepararon diluciones en serie de las muestras, en medio de cultivo VMGA I, variante en caldo del medio de cultivo utilizado para el transporte, y se inocularon 100 µl de cada una de ellas utilizando un asa de *Digralsky* estéril en dos medios de cultivo sólidos diferentes:

- por una parte en medio *Agar-Brucella*, para obtener el recuento total de bacterias orales viables.
- por otra, se sembraron placas de medio selectivo agar TSBV (*Trypticase Soy Agar-Bacitracin-Vancomycin*).

Las placas inoculadas de TSBV, para el crecimiento específico de *A. actinomycetemcomitans* fueron incubadas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C durante 3-5 días en estufa de incubación de CO<sub>2</sub>.

Las placas de *Agar-Brucella* fueron incubadas en anaerobiosis mediante el uso de jarras tipo *GasPacK* con sus respectivos sobres generadores e indicadores de anaerobiosis, también a 37°C durante 3-5 días.

#### 4.4. Identificación de *A. actinomycetemcomitans*

Después de 3-5 días de incubación en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, se leyeron las placas de TSBV Agar. Gracias a la especial morfología colonial de *A. actinomycetemcomitans*, pudimos realizar rápidamente su identificación presuntiva observándolas por transiluminación en la lupa binocular. Forma en los primeros aislamientos, colonias pequeñas, arrugadas, más o menos transparentes, adheridas al agar, pudiéndose observar una estructura interna en forma de estrella característica descrita anteriormente [177] [178].

A partir de algunas colonias en placa, se realizaron tinciones de Gram, observándose efectivamente pequeños coco-bacilos Gram-negativos aislados o formando pequeñas agrupaciones sin una disposición característica.

La identificación confirmativa de *A. actinomycetemcomitans* a partir de las colonias crecidas en el medio selectivo se realizó de acuerdo con los criterios descritos por Slots *et al.*, [179]: coco-bacilos Gram-negativos, capnofílicos (exhibiendo escaso crecimiento en condiciones aeróbicas y un buen crecimiento en atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>), fermentativos, catalasa-positivos y sin requerimientos de hemina y factor V para su crecimiento.

El test de la catalasa fue realizado directamente sobre la placa, observándose una gran liberación de O<sub>2</sub> en forma de burbujas de aire.

El test de MUG (4-Methylumbelliferil-B-D-galactosidasa), introducido por Alcoforado *et al.*, [180], se utilizó como instrumento identificativo diferenciador entre cepas periodontopatogénicas de *A. actinomycetemcomitans*, no fermentadoras de lactosa (MUG negativo), y cepas de *Haemophilus aphrophilus* (MUG positivo), sin papel aparente en las infecciones periodontales. En nuestro caso, se realizó directamente sobre la placa y se reveló iluminando con una lámpara de UV, la falta de fluorescencia es indicativa de *A. actinomycetemcomitans*.

Por último, las colonias escogidas fueron replicadas en medio agar TSBV y re-incubadas para posteriormente ser congeladas según el método descrito por Sébald *et al.*, [181], en caldo de cultivo TGY. Se utilizaron criotubos a los que se añadió glicerol estéril y las muestras fueron inicialmente congeladas durante 30 min a -20°C. Posteriormente fueron almacenadas a -80°C.

Así, fueron identificadas como *A. actinomycetemcomitans* un total de 12 cepas procedentes de diferentes aislamientos que, conjuntamente con las dos cepas de colección, constituyeron el material de estudio de este trabajo.

#### 4.5. Preparación de las soluciones

##### 4.5.1. Antibióticos

Los antibióticos utilizados en este trabajo para la determinación de la susceptibilidad de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, se exponen en la tabla 4.5.1. En todos los casos se esterilizaron por filtración, mediante filtros estériles con un diámetro de poro de 0.22 µm. Una vez disueltos y filtrados, se distribuyeron en alícuotas y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

La selección de los antibióticos utilizados se realizó siguiendo criterios clínicos, según su actual uso en odontología. El uso de la clindamicina se debió a nuestra intención de comprobar la alta resistencia de *A. actinomycetemcomitans* a dicho antibiótico, descrita previamente por otros autores [182].

#### 4.5.2. Colorantes

*Cristal violeta*: Se preparó una solución a concentración de 1 mg/ml, manteniéndose a temperatura ambiente protegida de la luz.

*Bromuro de Etidio*: Se preparó añadiendo 10 mg de bromuro de etidio a 1 ml de agua destilada estéril. Se mantuvo de igual forma a temperatura ambiente protegida de la luz.

#### 4.5.3. Detergentes

*SDS*: Se preparó un *stock* de dodecil sulfato sódico a una concentración final de 10% en agua destilada estéril.

#### 4.5.4 Inhibidor metabólico

*CCCP* (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona): Se preparó un *stock* en solución alcohólica de metanol a una concentración de 50 mg/ml. Se mantuvo a -20°C protegido de la luz.

| Antibiótico         | Concentración | Solvente/Conservación                          |
|---------------------|---------------|--|
| <b>Macrólidos</b>   |               |  |
| Eritromicina        | 1 mg/ml       | etanol absoluto                                |
| Clindamicina        | 2 mg/ml       | H <sub>2</sub> O                               |
| <b>Quinolonas</b>   |               |  |
| Ciprofloxacina      | 5 mg/ml       | NAOH 0.5N (PROTEGIDA LUZ)                      |
| Ácido Nalidíxico    | 5 mg/ml       | NAOH 0.5N (PROTEGIDA LUZ)                      |
| Norfloxacina        | 5 mg/ml       | NAOH 0.5N (PROTEGIDA LUZ)                      |
| Ofloxacina          | 5 mg/ml       | NAOH 0.5N (PROTEGIDA LUZ)                      |
| <b>β-Lactámicos</b> |               |  |
| Penicilina G        | 10 mg/ml      | H <sub>2</sub> O                               |
| Ampicilina          | 100 mg/ml     | NAOH 0.5N                                      |
| <b>Otros</b>        |               |  |
| Tetraciclina        | 2.5 mg/ml     | H <sub>2</sub> O/ etanol (v/v) (PROTEGIDA LUZ) |
| Cloramfenicol       | 10 mg/ml      | etanol absoluto                                |
| Metronidazol        | 1 mg/ml       | H <sub>2</sub> O/ etanol (v/v) (PROTEGIDA LUZ) |
| Amoxicilina         | 2 mg/ml       | H <sub>2</sub> O                               |

Tabla 4.5.1. Preparación de antibióticos utilizados

#### 4.6. Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos

El estudio de la susceptibilidad de las diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans* frente a la batería de antibióticos seleccionados y otras sustancias descritas anteriormente, se realizó siguiendo diferentes métodos *in vitro*. Se estudiaron las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de dilución en agar, y en caldo, y en este último caso, sometiendo a los cultivos a diferentes condiciones de incubación (con o sin agitación). Por otra parte, y para poner de manifiesto la naturaleza de la resistencia (inducible o constitutiva) a ciertos antibióticos, se realizaron antibiogramas mediante el método de difusión en placa, utilizando discos de celulosa impregnados de antibiótico.

##### 4.6.1. Antibiograma

Método basado en la utilización del principio de difusión del antibiótico a través del agar.

1. Se partió de un cultivo en placa del microorganismo, del cual se resuspendieron varias colonias en 2 ml de caldo TGY.
2. Se mojó extensamente un hisopo estéril en el tubo, sembrando inmediatamente el inóculo en placas TGY agar. Nos aseguramos de sembrar absolutamente toda la superficie del medio de cultivo.
3. Después de aproximadamente 10 minutos, nos aseguramos que las placas se encontraban secas y se depositaron los discos de antibiótico en la superficie sembrada del agar utilizando unas pinzas estériles.
4. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> hasta que se observó crecimiento visible.

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición, que aparecen alrededor de los discos, en milímetros. El diámetro del halo de inhibición fue proporcional a la susceptibilidad del microorganismo al antibiótico ensayado. Para conocer la susceptibilidad de cada una de las cepas, se compararon los resultados con las tablas de referencia establecidas y publicadas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) [183].

#### 4.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (*MIC*), se realizó por los métodos de dilución en caldo y en agar. Además, en el primer caso se hicieron ensayos incubando los experimentos con agitación o sin ella.

En todos los casos, debido a los requerimientos nutricionales de *A. actinomycetemcomitans* y, dada la imposibilidad de realizar los experimentos de forma estándar en *Müller-Hinton*, se empleó para llevarlos a cabo, el medio TGY de rutina que nos permitió un mejor crecimiento en cada uno de los distintos experimentos.

##### 4.6.2.1. Dilución en agar

En el método de dilución en placa se incluyó el antibiótico diluido en el medio de cultivo. El método seguido especificado por el NCCLS [184], fue el siguiente:

1. Se realizaron cultivos de cada una de las cepas en placa, dejándose a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 3-5 días hasta que se vio un crecimiento claro.
2. Se prepararon las placas con los diferentes antibióticos ensayados a las concentraciones deseadas, diluyendo la concentración de éstos en forma doble progresiva en cada una de las sucesivas diluciones. En cada experimento se incluyó una placa control sin antibiótico.
3. Se preparó una suspensión bacteriana a partir de algunas colonias crecidas en agar de un cultivo *overnight*, con una solución salina estéril (Ringer ¼).
4. La concentración de la suspensión se ajustó a 10<sup>5</sup> ufc/ml y se distribuyó con un replicador de *Steers* estéril en las placas previamente preparadas para el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*.
5. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta que se observó para cada experimento, crecimiento claro en la placa control sin antibiótico. Se realizó la lectura de los resultados.
6. La *MIC* del antibiótico se definió como la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

#### 4.6.2.2. Dilución en caldo

- a. Como en el caso anterior, se realizaron cultivos de cada una de las cepas en placa, dejándose a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 3-5 días hasta que se vio un crecimiento claro.
- b. Se preparó una suspensión bacteriana, ajustándola a 10<sup>5</sup> ufc/ml, a partir de algunas colonias crecidas en agar de un cultivo *overnight*, con una solución salina estéril (Ringer ¼).
- c. Se inocularon los diferentes bancos de diluciones de cada uno de los antibióticos añadiendo 10 µl de suspensión a un volumen final de 1 ml.

Los experimentos en caldo para cada uno de los antibióticos se realizaron por duplicado, incubándose uno de ellos en agitación e incluyéndose en cada uno de los tubos una varilla de cristal estéril con la intención de contrarrestar al menos en parte la naturaleza agregativa de algunas cepas en estudio.

En todos los casos, la incubación se realizó en atmósfera enriquecida de CO<sub>2</sub> a 37°C durante el período de tiempo necesario para observar crecimiento visible en el control sin antibiótico.

#### 4.6.2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en condiciones de inhibición del reflujo

El inhibidor CCCP se añadió a 1/32 de la *MIC* tanto en las series de placas como en los tubos de los bancos de diluciones preparados para cada antibiótico en caldo.

Como criterio para determinar la eventual resistencia se utilizaron los valores de las tablas publicadas por la NCCLS [185], en el cual se indica para cada antibiótico cual es el valor de resistencia dependiendo del microorganismo estudiado.

#### 4.7. Experimentos de reflujo

##### 4.7.1. Ensayos de crecimiento

Se determinó la curva de crecimiento para todas las cepas de *A. actinomycetemcomitans* incluidas en el estudio. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

- A partir de cultivos *overnight* en placas de agar TGY, se realizaron suspensiones bacterianas en 100 ml de medio de cultivo rutinario, hasta una densidad óptica a 550 nm alrededor de 0.2-0.3.
- Los cultivos se incubaron a 37 °C y se fueron realizando medidas de densidad óptica a 550 nm, a intervalos de tiempo de una hora. Las distintas medidas de densidad óptica obtenidas se representaron frente al tiempo.
- Paralelamente, se sembraron placas de las alícuotas tomadas en cada instante, previa dilución de las mismas. Éstas se incubaron 48 horas a 37 °C, con un 5 % de CO<sub>2</sub>.
- El recuento del número de colonias crecidas en las placas permitió establecer una correlación entre los valores de densidad óptica obtenidos y la concentración.

##### 4.7.2. Ensayos de inhibición del crecimiento

Se siguió el protocolo descrito anteriormente por otros autores [186], con algunas modificaciones.

- A partir de un cultivo *overnight* en placa, se realizó una suspensión bacteriana en 100 ml de medio hasta una densidad óptica a 550 nm de aproximadamente 0.2-0.3.
- A esta suspensión se le añadió una concentración de cada una de los antimicrobianos ensayados (antibióticos, colorantes y detergentes) utilizados de ¼ de la MIC previamente determinada.
- Cada cultivo se dividió en dos volúmenes iguales, y a uno de los cuales se le añadió CCCP a una concentración final de 1/32 de su MIC.



- Ambos cultivos se incubaron a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> y se fueron realizando medidas paralelas de absorbancia a 550 nm, a intervalos de tiempo de una hora.
- Las distintas medidas de densidad óptica se representaron frente al tiempo.

#### 4.7.3. Efecto de la concentración de antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano, en presencia y ausencia de CCCP

- A partir de un cultivo *overnight* en placa, se realizó una suspensión bacteriana en 100 ml de medio TGY hasta una densidad óptica a 550 nm de aproximadamente 0.2-0.3.
- Esta suspensión se repartió en diez tubos con volúmenes iguales, a los cuales se les añadió concentraciones crecientes del antimicrobiano a ensayar. Para ello se tomó como valor más elevado el correspondiente al doble de la *MIC* de cada una de las cepas para cada agente, y se realizaron diluciones a la mitad, hasta obtener un número aproximado de ocho concentraciones distintas. Se dejó en todos los casos un tubo como control positivo sin agente antimicrobiano.
- De cada uno de estos tubos se traspasó la mitad de su volumen a tubos nuevos y se añadió CCCP a concentración 1/32 de su *MIC* a la nueva serie.
- Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 15 horas y se realizaron medidas de la densidad óptica a 550 nm.
- Los valores obtenidos se representaron gráficamente.

#### 4.8. Análisis de proteínas de membrana externa

##### 4.8.1. Aislamiento de proteínas de membrana externa

Una propiedad común de la mayoría de las proteínas de membrana externa, que nos permite durante el protocolo de extracción, separarlas de las presentes en la membrana interna, es que son insolubles a bajas temperaturas en detergentes iónicos fuertemente desnaturizantes como el SDS, probablemente, debido a su asociación no covalente, pero fuerte con el peptidoglicano en las células vivas.

En la ejecución de este trabajo, se utilizó el método descrito por Puig *et al.*, [187] modificado, que brevemente se describe a continuación. Para la disrupción celular se

utilizó el método descrito por la Sociedad Americana de Microbiología [188], basado en la aplicación de sucesivos ciclos de congelación/descongelación.

1. Se hizo crecer la cepa LP08 en 5 ml de caldo TGY en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante al menos 48 h. hasta que se observó crecimiento.
2. El cultivo crecido se resembró en 50 ml y se volvió a incubar en las mismas condiciones.
3. Hicimos otra dilución hasta conseguir unos 500 ml de caldo TGY con suficiente crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*.
4. Centrifugamos a 8000 x g durante 30 min. a temperatura ambiente y resuspendimos el sedimento en 5 ml de solución tampón Tris-HCl 0.02 M pH 7.8 que contenía 5 mM EDTA, 0.25 M sacarosa y 0.5 g/ml de lisozima.
5. Se hicieron 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo en agua templada.
6. Las células rotas se resuspendieron en 20 volúmenes de tampón Tris-HCl 0.02 M pH 7.8 que contenía 0.5 mM MgCl y 0.1 mg/ml desoxiribonucleasa.
7. Se agitaron las muestras alrededor de 20 s, rompiéndose el DNA.
8. Las células enteras se descartaron en el sedimento centrifugando a 5000 x g durante 5 min.
9. Se recogió el sobrenadante (que incluía las diferentes fracciones de membrana) y se centrifugó a 35000 rpm durante 1 h.
10. El sedimento se resuspendió con SDS 2% en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 conteniendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM
11. Se volvió a centrifugar a 35000 rpm durante 1 h. En el sedimento obtuvimos la membrana externa y en el sobrenadante quedó solubilizada la interna.
12. Resuspendimos el sedimento en solución tampón Tris-HCl 10 mM o H<sub>2</sub>O destilada.

#### 4.8.2. Purificación de las porinas de *A. actinomycetemcomitans*

Las porinas pueden ser separadas del peptidoglicano y solubilizadas por una combinación de sales (0.1-0.5 M NaCl), EDTA y genapol [189]. Esta es una propiedad debida a la estabilidad de su estructura terciaria y cuaternaria, lo que las hace resistentes al tratamiento con detergentes a temperaturas moderadas.

El protocolo de extracción de porinas descrito en el apartado anterior se completó de la siguiente forma:

1. Se resuspendió durante toda la noche el sedimento de proteínas de membrana externa, con genapol al 2% en solución tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 conteniendo EDTA al 2%.
2. Se centrifugó la muestra a baja velocidad, (8000 rpm) durante 15 min.
3. Se recuperó el sobrenadante que contenía las porinas solubilizadas en el detergente.

#### **4.8.3. Análisis de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis SDS-PAGE separa las proteínas en función de su peso molecular. Todas las electroforesis se llevaron a cabo en un aparato *Mini-Protean II (BioRad)*. La medida de los geles fue de 100 mm de ancho, 80 mm de largo y 1 mm de grosor. La composición proteica de la membrana externa se analizó en un gel separador al 12% de acrilamida/bisacrilamida y un gel iniciador al 4% de acrilamida/bisacrilamida.

##### **4.8.3.1. Preparación de los geles de poliacrilamida**

En primer lugar se preparó el gel separador al 12% de acrilamida y se cargó entre los dos cristales previamente preparados que nos sirvieron de soporte para la polimerización del gel. Para evitar que estuviera en contacto con el aire y así favorecer su polimerización, se añadió una capa de isobutanol saturado en H<sub>2</sub>O y se dejó polimerizar durante 30 min.

1. Una vez polimerizado, (30 minutos después) se extrajo el isobutanol, lavándose tres o cuatro veces con agua destilada para eliminar los residuos.
2. A continuación se introdujo el gel iniciador al 4% de acrilamida/bisacrilamida sobre el gel separador y se colocó el peine para la formación de los pozos de carga de las muestras.

3. Una vez polimerizado, (unos 45 minutos después), se extrajo el peine, se montó el gel en la cubeta de electroforesis donde añadimos el tampón de corrida (*running buffer*), y se cargaron las muestras (con o sin tratamiento previo de ebullición durante 10 minutos) acompañadas de 10  $\mu$ l de *loading buffer*, cuya composición, así como la de los geles, se detalla a continuación:

*GEL SEPARADOR (12% acrilamida).*

|  |            |
|--|------------|
| 1. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8                 | 1.25 ml    |
| 2. SDS 10% (w/v)                         | 50 $\mu$ l |
| 3. Sol. Acrilamida/Bisacrilamida.30% (*) | 2 ml       |
| 4. Agua destilada                        | 1.68 ml    |

Se desgasificó la mezcla al vacío para impedir que el oxígeno inhibiera la polimerización. Justo antes de su carga, se añadieron los componentes que catalizan la polimerización:

|            |              |
|------------|--------------|
| 5. APS 10% | 25 $\mu$ l   |
| 6. TEMED   | 2.5 $\mu$ l. |

*Persulfato amónico (APS)* al 10%: Se utilizó inmediatamente después de su preparación, o bien, se preparó, se distribuyó en alícuotas y se conservó a -20°C.

(\*) *Solución de acrilamida*: La solución de acrilamida estaba formada por un stock al 30% de acrilamida/bisacrilamida y se preparó de la siguiente manera:

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Acrilamida                  | 29.2 g |
| N’N’-bis- metilenacrilamida | 0.8 g  |
| Agua destilada              | 100 ml |

Esta solución se filtró y almacenó a 4°C protegida de la luz. Se utilizó antes de los 30 días.

*GEL INICIADOR (4% acrilamida).*

|                          |             |
|--------------------------|-------------|
| 1. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 | 830 $\mu$ l |
| 2. SDS 10% (w/v)         | 33 $\mu$ l  |

|                             |             |
|-----------------------------|-------------|
| 3. Sol. Acril/Bisacril. 30% | 430 $\mu$ l |
| 4 Agua destilada            | 2.03 ml     |

Justo antes de cargar el gel iniciador, añadimos los componentes que permitieron su polimerización:

|            |              |
|------------|--------------|
| 5. APS 10% | 16.5 $\mu$ l |
| 6. TEMED   | 3.5 $\mu$ l  |

*Loading buffer*

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Agua destilada                 | 4 ml   |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8          | 1 ml   |
| Glicerol                       | 0.8 ml |
| SDS 10% (w/v)                  | 1.6 ml |
| 2- $\beta$ -mercaptoetanol     | 0.4 ml |
| Azul de bromofenol 0.05% (w/v) | 0.2 ml |

**4.8.3.2. Recorrido de las muestras**

Se aplicó un voltaje inicial de 70 V hasta que las muestras se concentraron en la interfase entre ambos geles. Una vez en ese punto, incrementamos el voltaje hasta 100-120 V para que las muestras corrieran a través del gel separador.

*Running buffer (x5)*

|           |          |
|-----------|----------|
| Tris Base | 15.0 g/l |
| Glicina   | 72.0 g/l |
| SDS       | 5.0 g/l  |

Equilibrado a un pH de 8.3.

**4.8.3.3. Tinción de los geles**

1. En primer lugar se tiñeron los geles con la solución I de azul de *Coomassie* (se preparó mezclando 5 volúmenes de metanol con 1 de ácido acético y 5 de H<sub>2</sub>O destilada, añadiendo azul de *Coomassie*) durante al menos 1 h.

2. Posteriormente, se decantó la solución I y se añadió solución II (5 volúmenes metanol, 1 ácido acético, 5 H<sub>2</sub>O destilada). En esta solución de fijación, se dejó el gel durante 1 hora con dos o tres cambios de solución nueva hasta que quedó totalmente incoloro.
3. Para acabar, se decantó la solución II y se añadió solución III (1 volumen de metanol, 1 acético, 18 H<sub>2</sub>O destilada). Se trata de una solución de hidratación, en la que el gel se pudo mantener indefinidamente.

#### 4.8.4. Medida de la conductancia de canal simple (*conductance of single channel in black lipid bilayer technique*)

Se han descrito diversas metodologías para medir la capacidad formadora de poros en membranas lipídicas. Uno de los métodos más comúnmente aceptado es el desarrollado por Benz y colaboradores en la Universidad de Wurzburg (Alemania) basado en la medida de la conductancia, en diversas condiciones, de porinas que son añadidas a una cámara de teflón separada en dos compartimentos por un tabique también de teflón que deja en su centro un pequeño orificio con una superficie de aproximadamente 0.4 mm<sup>2</sup> (figura 4.8.4) [190] [191]. En este orificio se formará una bicapa lipídica, que con la ayuda de un telescopio observaremos de color negro.

El método de preparación consiste en llenar ambas bandas de la cámara con una solución salina que contenga la sal que queramos utilizar y formar la bicapa lipídica en el pequeño agujero central. Las soluciones salinas acuosas fueron utilizadas sin solución tampón y a un pH aproximado de 6. La temperatura se mantuvo durante todos los experimentos a 20°C. Las membranas se formaron a partir de una solución de difitanoil fosfatidilcolina (DiPhPC) al 1% (peso/vol) en n-decano. Una vez se formó la bicapa lipídica, relativamente estable, se iniciaron los experimentos para probar condiciones diferentes.

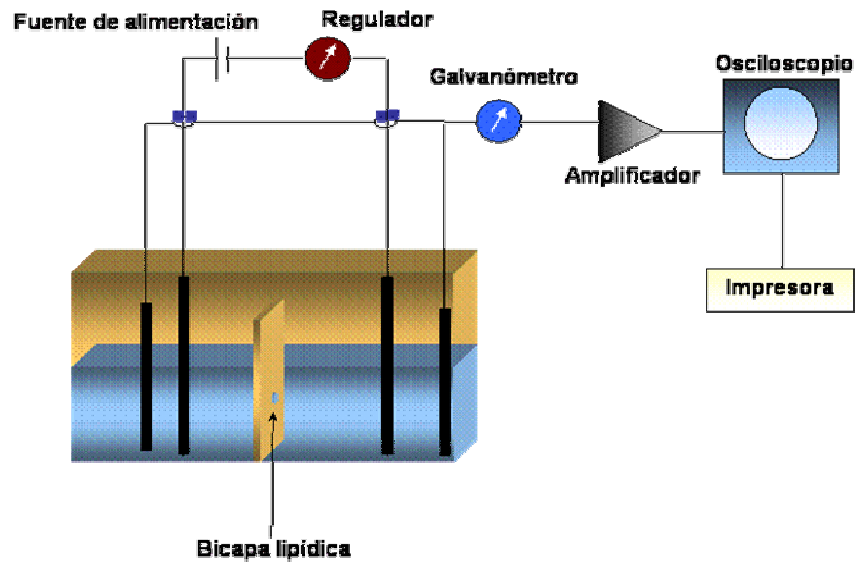


Figura 4.8.4. Esquema del diseño experimental utilizado para los experimentos de *Planar Lipid Bilayer*.

Las medidas de canal simple se realizaron con un par de electrodos de Ag/AgCl conectados en serie a una fuente de alimentación y a un amplificador de corriente. La señal de amplificación fue monitorizada con un osciloscopio y un registrador. Cuando la membrana estuvo bien estabilizada, es decir, era ópticamente negra a la luz reflejada, se añadió la solución madre que contenía la proteína Omp39 de *A. actinomycetemcomitans* (aproximadamente 100 ng/ml). A un potencial de membrana de 20 mV se registraron las perturbaciones de la conductancia a través de la membrana, que posteriormente sirvieron para calcular la conductividad (G).

Los experimentos se realizaron con las siguientes soluciones salinas:

- a) KCl a las concentraciones de 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 M
- b) LiCl a la concentración de 1M
- c) Acetato potásico a la concentración de 1M

#### 4.8.4.1. Evaluación de la dependencia de voltaje y selectividad de canal

Para analizar si la conducción de la membrana provocada por la proteína dependía del voltaje aplicado, se diseñó el experimento siguiente. Se formaron membranas en una solución 100 mM de KCl y se fue añadiendo proteína hasta que la conductancia fue de al menos 0.1 nS. Seguidamente se llevó el voltaje a cero (el valor potencial de membrana en este punto se designó como  $V_m$ ), y a continuación se estableció un gradiente de KCl, cinco veces mayor, añadiendo una solución de 3 M KCl a un lado de la membrana, en agitación. El voltaje de membrana de corriente cero llegó a su valor en 2-5 minutos después de la adición de cloruro potásico.

Con el valor de  $V_m$  y conociendo las concentraciones iónicas en los dos compartimentos de la cámara de teflón (100 mM y 500 mM de KCl), se pudo calcular el coeficiente de permeabilidad catión/anión ( $P_c/P_a$ ) utilizando la ecuación de *Goldman-Hodgkin-Katz*:

$$V_m = (R * T / F) * \ln [ (P_c * c_{II} + P_a * c_I) / ( P_c * c_I + P_a * c_{II} ) ]$$

Donde:

$R$  es la constante de gases;  $T$  es la temperatura absoluta;  $F$  es la constante de *Faraday*;  $c_I$  es la concentración más baja (de cada uno de los iones) de entre ambos compartimentos;  $c_{II}$  es la concentración más alta ;  $P_c$  es la permeabilidad catiónica y  $P_a$  la permeabilidad aniónica.

#### 4.8.4.2. Estimación del diámetro de canal.

El diámetro del poro que forma la proteína puede estimarse suponiendo iguales las movilidades relativas de los diferentes iones utilizados tanto en solución acuosa como en el interior del poro. Por lo tanto, la conductancia ( $G$ ) puede utilizarse para estimar el diámetro de canal que forma la porina, según la ecuación siguiente.

$$G = p \cdot \pi \cdot r^2 / l$$

Siendo  $p$ : conductancia de la fase acuosa, compuesta por KCl 1 M (110 mS/cm).



#### 4.9. Técnicas de extracción de DNA

##### 4.9.1. Extracción de DNA cromosómico

Se utilizó el método descrito por Marmur en 1961, modificado por Lenaroz *et al.*, [192], tal y como se describe a continuación.

1. Se sembró la cepa de *A. actinomycetemcomitans* LP08 en 5 ml de TSY caldo y se incubó a 37 °C durante 48 h en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.
2. A partir del subcultivo, se inoculó 1 ml de crecimiento bacteriano en 500 ml de TSY caldo y se incubó de nuevo durante 24-48 h en atmósfera enriquecida de CO<sub>2</sub>.
3. Se recogieron las células por centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron con 50 ml de solución de NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M pH 8.0. Posteriormente, se añadió a esta solución 1 ml de lisozima al 1% en 0.25 M Tris HCl pH 8.0 y se incubó la mezcla en hielo durante 10 minutos.
4. Se añadieron 10 µl de una solución de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml y se agitó suavemente la mezcla. Las células se rompieron añadiendo 2.63 ml de SDS al 20% (hasta conseguir una concentración final del 1%) durante 10-15 minutos. Un cambio brusco de la viscosidad de la solución fue indicativo de la lisis celular.
5. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, añadiéndose 13.16 ml de NaClO<sub>4</sub> 5M, de manera que la concentración final del perclorato sódico fue de 1 M, y a continuación se agitó. Una elevada concentración de sales ayudó a disociar las proteínas de los ácidos nucleicos.
6. Después de agitar, se añadieron 32.9 ml (0.5 volúmenes sobre el total) de una mezcla de cloroformo: isoamílico, en proporción 24:1, y se agitó vigorosamente durante 3 minutos en un agitador recíproco hasta conseguir una emulsión lechosa.
7. Se centrifugó a 17000 x g durante 10 minutos a 4°C, para separar la fase orgánica y la fase acuosa. Se recogió la fase superior acuosa procurando no arrastrar la interfase blanca, compuesta por los restos celulares.
8. Se repitió la extracción con cloroformo: isoamílico 24:1 y se recogieron todas las fases acuosas en un vaso de precipitados de vidrio, previamente esterilizado.

9. El DNA cromosómico presente se precipitó añadiendo a la fase acuosa 2 volúmenes de etanol al 95%, recogiénose instantáneamente enrollándolo en una varilla de cristal estéril.
10. Seguidamente, el DNA se disolvió en 15 ml de solución tampón de citrato disódico SSC x 0.1. Una vez resuspendido, se ajustó la concentración de SSC hasta x 1, añadiendo 0.85 ml de SSC x 20.
11. El RNA presente en la suspensión fue eliminado mediante un tratamiento de RNAsa a una concentración final de 50 µg/ml, incubándose durante 30 minutos a 37°C.
12. Después del tratamiento con RNAsa, la solución se transfirió a tubos de polipropileno y se añadió el mismo volumen de una solución fenol: cloroformo. Se mezcló y se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos.
13. Se recogió la fase acuosa y se volvió a repetir la extracción con fenol: cloroformo hasta que hubo una total ausencia de interfase de proteínas celulares.
14. Finalmente, se añadió a la muestra un volumen igual de cloroformo: isoamílico. Se agitó y se centrifugó. Esta extracción permitió eliminar los restos de fenol que pudieran haber quedado en la fase acuosa.
15. El DNA solubilizado se precipitó añadiendo 0.125 volúmenes de acetato sódico 3 M y 0.625 volúmenes de isopropanol. La solución se dejó a -20°C durante 2 horas, sedimentándose a continuación el DNA por centrifugación a 10000 x g a 4°C durante 10 minutos.
16. Se lavó el sedimento con etanol 70% frío, sin resuspender, y se repitió la centrifugación, decantando el sobrenadante y sacando los restos de etanol al vacío.
17. Finalmente, el DNA cromosómico se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril o tampón TE.
18. Se determinó la concentración de DNA espectrofotométricamente.

*Proteinasa K*

Proteinasa K            20 mg

H<sub>2</sub>O MiliQ            1 ml

Se adicionó cada uno de los componentes en el orden señalado, se agitó hasta una completa disolución. Se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -20°C.

*RNAsa (10 mg/ml)*

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| RNAsa A            | 0.010 g     |
| Tris HCl 1M pH 7.5 | 10 $\mu$ l  |
| NaCl 5 M           | 3 $\mu$ l   |
| H2O MiliQ          | 987 $\mu$ l |

Se disolvieron todos los componentes y se calentó la mezcla a 100°C durante 15 min. Se dejó enfriar en hielo y se repartieron alícuotas de 20  $\mu$ l, que se almacenaron a -20°C.

*Solución de fenol: Fenol bidestilado equilibrado a pH 7.8*

A 250 ml de fenol se añadió 0.25 g de 8-hidroxiquinoleína que actúa como antioxidante y proporciona una coloración amarillenta que permite distinguir la fase fenólica de la acuosa.

Se mezcló con un exceso de solución tampón de Tris HCl 0.5 M pH 8.0 y se dejó reposar hasta que las dos fases se separaran. A continuación se eliminó el tampón, reemplazándolo por uno nuevo. Este procedimiento se repitió hasta que el pH de la fase acuosa se situó alrededor de 7.8, dándose por finalizado el equilibrio. El fenol se conservó a 4°C y protegido de la luz.

*Solución de cloroformo isoamílico (24:1)*

Se mezclan, 24 volúmenes de cloroformo y un volumen de alcohol isoamílico.

*Solución de fenol: cloroformo (1:1)*

Se mezcla, en la proporción adecuada, al 50%, la solución de fenol y la solución de cloroformo: isoamílico.

*Solución SSC x 20*

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Citrato di sódico pH 7.0 | 0.015 M |
| NaCl                     | 0.15 M  |

Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121°C.

*Solución tampón TE*

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Tris HCl pH 8.0 | 10 mM |
|-----------------|-------|

EDTA 0.5 M pH 8.0                      1 mM

Se mezcló bien y se ajustó el pH a 8.0. Se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### 4.10. Técnicas de cuantificación y visualización de DNA

##### 4.10.1. Cuantificación de DNA

La concentración de DNA se determinó mediante un espectrofotómetro, *modelo UV/Vis Spectrometer UV2*, de la casa ATI UNICAM. Se midió la densidad óptica del DNA (o de una dilución del mismo en agua) a 260 nm y a 280 nm, en cubeta de cuarzo. Como blanco para la medición se utilizó agua MiliQ. Se estimó el valor de la concentración considerando que un valor de densidad óptica igual a 1, a 260 nm, equivale a 50 µg/ml de DNA. Asimismo, se determinó el grado de pureza del DNA, teniendo en cuenta la relación entre las densidades ópticas a 260 nm y 280 nm. Así pues, los cálculos realizados fueron los siguientes:

|   |
|---|
| $\text{Concentración estimada } (\mu\text{g/ml}) = 50 \cdot DO (260 \text{ nm}) \cdot \text{factor de dilución}$ $\text{Pureza del DNA} = DO (260 \text{ nm}) / DO (280 \text{ nm}), \text{ Valor aceptable entre } 1.8 \text{ y } 1.9 (*)$ |
|---|

(\*) Coeficiente > 2.2, significa que hay proteína libre en la muestra

##### 4.10.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis se basa en la carga negativa que presenta el DNA a pH neutro, y que condiciona su migración hacia el polo positivo cuando está sometido a un campo eléctrico. Forzando este desplazamiento a través de una matriz porosa, se consigue una separación por tamaño (la velocidad de migración es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular), de los diferentes fragmentos de DNA que pueda contener una mezcla heterogénea, valorando su tamaño frente a un patrón de medidas adecuado.

Es una técnica básicamente analítica, ya que se utilizó para separar, visualizar e identificar fragmentos de DNA, así como para permitir el aislamiento de un determinado fragmento a partir de una muestra heterogénea. Se utilizaron concentraciones de agarosa del 0.7% para la valoración de fragmentos entre 20 y 1 Kb,

y del 1% de agarosa para la valoración de fragmentos menores de entre 6 y 0.4 Kb. De manera rutinaria, se utilizó el método, según el procedimiento descrito por Sambrook, *et al.* [193].

1. Se añadió la cantidad necesaria de agarosa a tampón TAE x 1. La agarosa utilizada fue del tipo de baja densidad de carga, para evitar la posible distorsión de la migración del DNA.
2. Se calentó la solución sin que llegara a hervir hasta que la agarosa quedó totalmente fundida.
3. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml.
4. Una vez solidificada en el soporte adecuado, se extrajo el peine que nos permitió marcar los pozos de carga y el soporte con el gel se introdujo en la cubeta de electroforesis, llena del mismo tampón, TAE x 1.
5. Las muestras se cargaron en los pozos, previamente diluidas en solución tampón de carga x 1
6. A continuación, se aplicó un voltaje constante entre 50 y 100 voltios. El tiempo de electroforesis dependió en cada caso de la medida de los fragmentos y del voltaje aplicado.
7. El gel se observó en todos los casos con un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm).

*Solución TAE x 50*

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Tris                  | 242 g   |
| EDTA 0.5 M pH 8.0     | 100 ml  |
| Ácido acético glacial | 57.1 ml |
| Agua destilada        | 1 l     |

*Tampón de carga x 6*

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Azul de bromofenol    | 0.25% |
| Xileno cianol         | 0.25% |
| Glicerol o Ficoll 400 | 30%   |

Como marcadores de tamaño molecular se utilizó una mezcla de fragmentos resultantes de la digestión del DNA del bacteriófago *lambda* con *Hind*III, que cubría un rango entre 23 y 0.5 Kb. Para valorar fragmentos más pequeños se utilizó el marcador *GeneRuler 100bp DNA Ladder plus* (Fermentas) que cubría un rango de entre 10 y 0.25 Kb (figura 4.10.2).

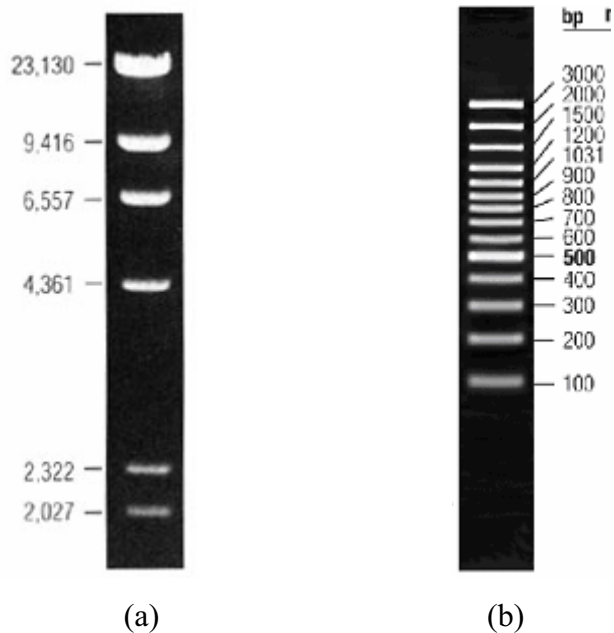


Figura 4.10.2: Patrones utilizados en la identificación de la medida de los fragmentos de DNA, (a) marcador  $\lambda$ HindIII; (b) marcador *GeneRuler100bp DNA Ladder plus*.

#### 4.10.3. Electroforesis de campo pulsante (PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis*)

Técnica que se empleó para separar moléculas de DNA de tamaño superior a 20 Kb, ya que la electroforesis convencional en gel de agarosa al 0,5 -1,0% no separa moléculas mayores a este tamaño. En nuestro caso, buscamos plásmidos de gran tamaño en las cepas de *A. actinomycetemcomitans*. En esta técnica, se producen alteraciones frecuentes de la dirección del campo eléctrico al utilizar al menos dos campos eléctricos alternativos que se cruzan en el plano del gel.

El procedimiento seguido para realizar la electroforesis, se basó en el descrito también para *A. actinomycetemcomitans* por Valcarcel *et al.*, [16].

1. Se preparó un gel de agarosa normal al 1% en 0.5 x TBE, mezclando los componentes e hirviendo durante 5-10 min.
2. Se dejó enfriar a continuación la solución durante 30 minutos en agitación.

3. Seguidamente se procedió a la preparación del molde (*BioRad*). Se seleccionó el peine más adecuado al número de muestras y se dejó polimerizar la agarosa. El gel se introdujo en la cubeta de electroforesis.
4. A continuación, se cargaron las muestras previamente preparadas, en las ranuras o pocillos del peine y se rellenó la cubeta de electroforesis *Chef-DR III (BioRad)* con 2 litros de tampón 0.5 x TBE. El aparato se programó a 20 h, a una temperatura de 14 °C y en pulsos de 45 s durante 14 h y 25 s durante las siguientes 6 h.
5. Una vez finalizada la electroforesis, el DNA se visualizó mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta.

*Preparación del gel de agarosa al 1%.*

Para un volumen final de 150 ml:

|                |          |
|----------------|----------|
| 10 x TBE       | 7.5 ml   |
| Agua destilada | 142.5 ml |
| Agarosa        | 1.5 g    |

*Tampón TBE x 10.*

Para un volumen final de 1 litro:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris Base         | 108 g |
| Ácido bórico      | 55 g  |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 40 ml |

Añadir agua destilada hasta 1 litro

Como marcador de tamaño molecular se utilizó el *Low Range Pfg Marker* de *BioLabs*, figura 4.10.3, que nos permitió cubrir un rango de pesos moleculares de hasta prácticamente 200 Kb.

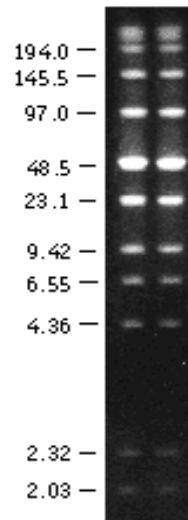


Figura 4.10.3. Patrón de pesos moleculares utilizados para *PFGE*.

#### 4.11. Técnicas de manipulación de DNA

##### 4.11.1. Preparación de muestras para *PFGE*. (*Pulse Field Gel Electrophoresis*)

El protocolo seguido para la preparación previa de las muestras ensayadas, descrito por Barton *et al.*, [194], fue el siguiente:

1. Se sembraron todas las cepas en medio TGY incluyendo los controles
2. Al día siguiente, se mantuvo una solución de agarosa (bajo punto de fusión) al 1.5% fundida, con la ayuda de un baño y por encima de 40°C.
3. Se resuspendieron las colonias que pudieron cogerse en un asa de cultivo en 200 µl de PIV.
4. Se mezclaron 100 µl de PIV conteniendo las células, con 100 ml de la solución de agarosa fundida. Se agitaron rápidamente evitando que se enfriaran en exceso.
5. Se cargó la mezcla en los moldes de plástico (alrededor de 90-100 µl por pocillo), congelándose durante 5 minutos a -20°C.
6. Se descongelaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT).
7. Seguidamente se prepararon 14 alícuotas de 1 ml de tampón de lisis (ST). (Igual número al de microorganismos que se estaban analizando).
8. Se añadió a cada ml de ST, 5 µl de RNAsa (10 mg/ml), 2 µl de lisozima (50 mg/ml) y 50 µl de solución *Brij 58* (10%).



9. A continuación, se introdujo cada bloque de agarosa en 1 ml de ST previamente completado, incubándose durante 5 horas a 37°C.
10. Se sustituyó la solución de lisis por 1 ml de solución ES + Prot. K. (900 µl de solución ES + 100 µl de Prot. K (10 mg/ml), incubándose durante 18 horas a 50°C.
11. Una vez completada la incubación, se sustituyó la solución ES + Prot. K. por 1 ml de tampón TE.
12. Se conservaron las muestras a 4°C hasta su análisis electroforético.

*PIV*

Composición para 1 litro:

|                |        |
|----------------|--------|
| Tris 1 M       | 10 ml  |
| NaCl 5 M       | 200 ml |
| Agua destilada | 790 ml |

Posteriormente se prepararon alícuotas que se conservaron a 4°C.

*SOLUCION ST (LISIS)*

Para preparar 100 ml se mezclaron:

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8.0         | 0.6 ml |
| NaCl 5 M                | 20 ml  |
| EDTA 0.5 M pH 8.0       | 20 ml  |
| Desoxicolato sódico 10% | 2 ml   |
| Sarcosil 10%.           | 5 ml   |

Se prepararon alícuotas que se conservaron a 4°C.

*SOLUCION ES (para incubación con Prot.K)*

Para 100 ml

|                   |       |
|-------------------|-------|
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 90 ml |
| Sarcosil 10%.     | 10 ml |

Se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 20 minutos y se prepararon alícuotas que se conservaron a 4°C.

### SOLUCION TE

Para 1 litro

Tris 1 M pH 7.5                                  10 ml

EDTA 0.5 M pH 8.0                              2 ml

Agua destilada                                  988 ml

Como en el caso anterior, se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 20 minutos, alicuotándose para su almacenamiento a temperatura ambiente.

#### 4.11.2. Amplificación de un fragmento de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Saiki *et al.*, [195], que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular. Se basa en la amplificación de forma exponencial *in vitro* de un fragmento específico de DNA localizado entre dos regiones de secuencia conocida. Además de obtener grandes cantidades de DNA a partir de un ácido nucleico molde, hace posible la introducción de modificaciones específicas, con dianas de restricción en los extremos del DNA, mutagénesis dirigidas, etc.

Para la amplificación de diversos fragmentos de DNA correspondientes a genes de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, se utilizó por tanto el método de la reacción en cadena de la polimerasa. Los oligonucleótidos o cebadores utilizados para amplificar estos genes, se muestran en la tabla 4.11.2.

Las condiciones experimentales dependieron en gran medida del fragmento de DNA que se buscó amplificar, así como de las características intrínsecas de los cebadores de elección. Las condiciones de los ciclos de cada uno de los experimentos se especifican en cada caso en los apartados correspondientes. La temperatura de hibridación DNA/cebador se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Temperatura de fusión} = (2 \times (A + T)) + ((G + C) \times 4),$$

y la temperatura de hibridación o *annealing*, mediante la siguiente:

$$\text{Temperatura de hibridación} = \text{Temperatura de fusión} - 5^{\circ}\text{C}.$$

Las diversas reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600*.

| Gen buscado         | Nombre del cebador | Secuencia del cebador               |
|---------------------|--------------------|-------------------------------------|
| <i>acrAB</i>        | hacrR-up           | 5'-CCTCAGAATTCTTATCACTCAAATAGG-3'   |
| <i>acrAB</i>        | hacrB-up           | 5'-GTCCAGAATTCAACGGTTGCAATATCACG-3' |
| <i>Int. clase I</i> | 5'CS               | 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3'             |
| <i>Int. clase I</i> | 3'CS               | 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'             |

Tabla 4.11.2. Oligonucleótidos utilizados en los diferentes estudios

#### 4.11.2.1. Amplificación de *acrAB*

Se realizaron extracciones de DNA de todas las cepas en estudio, de *H. influenzae Rd*, que sirvió de control positivo y de *E. coli* AG100, como control negativo. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos para *H. influenzae* por Sánchez *et al.*, [196], para buscar el gen en las cepas de *A. actinomycetemcomitans*.

La mezcla de la reacción (100 µl por muestra) incluía 2.5 unidades de enzima *Taq* polimerasa (*Pharmacia*), 1 µM de cada cebador, 0.1 mM de cada dideoxinucleósido trifosfato, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 ng de DNA cromosómico y 1 x de tampón de PCR (*Pharmacia*).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

|                   |   |                                 |
|-------------------|---|---------------------------------|
| Desnaturalización | 94°C  | 1'                              |
| 35 ciclos         | $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ 50^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$ | 1' ( <i>desnaturalización</i> ) |
|                   |   | 1' ( <i>hibridación</i> )       |
|                   |   | 3' ( <i>extensión</i> )         |
| 1 ciclo           | 72°C  | 10'                             |

#### 4.11.2.2. Búsqueda de integrones de clase I.

A partir de extracciones de DNA cromosómico de las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans*, se buscó amplificar las secuencias pertenecientes a las regiones conservadas flanqueantes de integrones clase I, utilizando los cebadores específicos descritos por Levesque *et al.* [197]. Como control positivo se utilizó la cepa P1 de *P. aeruginosa* en la cual ya se habían amplificado los integrones previamente. Las condiciones de amplificación fueron las que siguen:

|                   |   |                                 |
|-------------------|---|---------------------------------|
| Desnaturalización | 94°C  | 5'                              |
| 35 ciclos         | $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ 55^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$ | 1' ( <i>desnaturalización</i> ) |
|                   |   | 1' ( <i>hibridación</i> )       |
|                   |   | 5' ( <i>extensión</i> )         |
| 1 ciclo           | 72°C  | 1'                              |

En este caso, la mezcla de la reacción, sobre 100 µl de volumen total, contenía 10 µl de 10 x *buffer* de PCR, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml de gelatina, 10 µl de 10 x *deoxynucleoside triphosphate mix*, 2.5 pM de cada cebador, 30 µl de suspensión de DNA molde y 30 µl de agua destilada Mili Q.

#### **4.11.3. Precipitación de DNA**

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, con alguna modificación:

1. Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío.
2. Se incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h ó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.
3. Posteriormente, se centrifugó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 10000 g durante 20-30 minutos.
4. Se lavó el sedimento con etanol al 70 % frío.
5. Posteriormente, se secó en una estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada o solución TE.

#### **4.11.4. Recuperación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Fragmentos de DNA resueltos electroforéticamente en geles de agarosa pudieron ser recuperados y purificados a partir del gel, para utilizarse en aplicaciones posteriores y futuras. Una vez separados los fragmentos, el protocolo consistió en recortar las bandas quedándonos con la menor porción de agarosa posible, con una hoja estéril de bisturí, y bajo iluminación ultravioleta de baja energía. La pieza de agarosa se depositó en un tubo *ependorf* previamente tarado. Se pesó la pieza de agarosa y se procedió a la purificación del DNA contenido utilizando el *MiniElute Gel Extraction Kit* de QUIAGEN.

#### **4.11.5. Purificación productos de PCR**

Para limpiar los productos de amplificación obtenidos por PCR de sales, nucleótidos y otros componentes indeseables, se utilizó el *MinElute PCR Purification Kit* de QUIAGEN, que permite purificar fragmentos amplificados de DNA de entre 70pb y 4Kb, obteniendo fragmentos de DNA altamente concentrados.

#### **4.11.6. Secuenciación de genes**

El método utilizado fue el basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos. En todos los casos se secuenciaron las dos cadenas de DNA complementarias analizadas.

Se utilizó el Kit de fluorescencia automática *Big Dye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems*, que contenía una mezcla de dideoxinucleótidos fluorescentes (*Terminator Reaction Mix*) y polimerasa, acompañada de agua desionizada.

La mezcla de reacción para la PCR de secuenciación fue:

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| <i>Terminator Reaction Mix</i> | 4.0 µl   |
| Producto de PCR (10-30 ng/µl)  | 1.0 µl   |
| Cebador (primer)               | 3.2 pmol |
| H <sub>2</sub> O MiliQ estéril | 20.0 µl  |

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

|                   |   |   |
|-------------------|---|---|
| Desnaturalización | 96°C  | 2'  |
| 25 ciclos         | <div style="font-size: 3em; vertical-align: middle; padding-right: 10px;">{</div> | 96°C      30'' ( <i>desnaturalización</i> ) |
|                   |   | 50°C      15'' ( <i>hibridación</i> )       |
|                   |   | 60°C      4' ( <i>extensión</i> )           |

Acabada la PCR de secuenciación, el DNA se precipitó según el siguiente procedimiento:

1. Se añadieron 63 ml de etanol al 95% a los 20 µl de la reacción de secuenciación, y se llevó la muestra hasta un volumen final de 100 µl.
2. Se mezcló bien, dejándose precipitar a continuación a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos.
3. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos.
4. El sedimento obtenido se lavó dos veces con etanol 70%, dejándose secar.
5. Una vez seco, se almacenó a -20°C hasta la secuenciación.

La secuencia de DNA fue determinada en el servicio de secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

#### **4.11.7. Comparación y alineación de secuencias**

Existen diferentes métodos de búsqueda y comparación de secuencias, que pueden dividirse en dos grandes grupos: los métodos formales y los aproximativos. Los primeros posibilitan la realización de búsquedas complejas, permitiendo determinar coincidencias exactas, multiplicidades, inserciones o deleciones, pero requieren el uso de maquinaria más especializada. Por otra parte, los métodos aproximados también permiten el mismo tipo de determinaciones, pero no garantizan encontrar las mejores comparaciones y pueden perderse algunas similitudes significativas. Sus resultados requieren una interpretación más detallada pero son mucho más rápidos. Los más utilizados son el FASTA y el BLAST, ambos basados en la realización de análisis comparativos de secuencias.

Para las comparaciones y búsqueda de secuencias homólogas, en este trabajo, se ha utilizado principalmente el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) del NCBI (*National Center for Botechnology Information*).

## ***5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---





## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

El desarrollo de los cultivos de esta especie bacteriana tiene algunas particularidades que conviene señalar. Si se compara la capacidad de crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* con la de bacterias que normalmente se han relacionado con ella tales como las Enterobacterias o *Haemophilus*, lo primero que destaca es su velocidad de crecimiento aparente. Los cultivos adquieren aspecto de tener un buen crecimiento en aproximadamente el doble de tiempo que las bacterias citadas. Así solo podemos ver crecimiento franco tras 28/30 horas de incubación (figura 5.1).

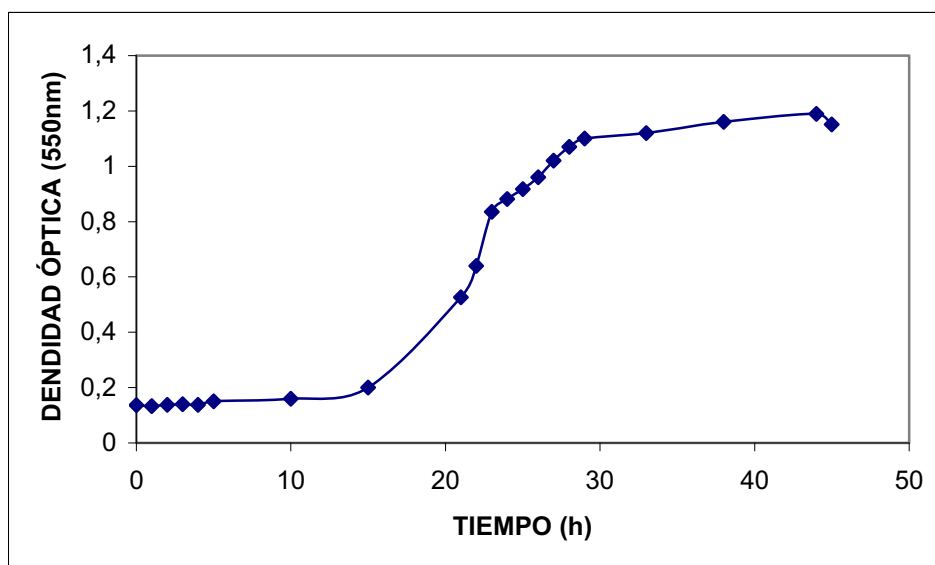


Fig 5.1. Curva de crecimiento de la cepa LP 08 de *A. actinomycetemcomitans* en medio TGY incubado a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>.

Sin embargo, esta velocidad de crecimiento, más que a una verdadera baja velocidad, si observamos la curva, parece ser debida al hecho de que las fases de latencia son extraordinariamente prolongadas. Si calculamos la velocidad de crecimiento en la zona de crecimiento exponencial no se observan grandes diferencias con las velocidades de crecimiento que se obtienen en condiciones óptimas para bacterias que normalmente se consideran de crecimiento rápido.

Aplicando la fórmula  $\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / T_t - T_0$  entre las horas 21 y 23 se obtiene una velocidad de crecimiento de 0.23 h<sup>-1</sup> (podríamos interpretar este valor como  $\mu_{\max}$ ) es

decir un tiempo de generación de 0.16 horas, que es una velocidad altísima (de las más altas descritas) . Piénsese que una velocidad de este tipo es la que alcanza *Beneckea (Vibrio) natriegens* que es la bacteria de rápido crecimiento por definición. Por el contrario si realizamos los cálculos en un período de tiempo mayor, por ejemplo en el periodo de 9 horas desde que comienza la fase logarítmica hasta que termina, la velocidad calculada es de  $\mu = 0.30 \text{ h}^{-1}$ , es decir aproximadamente el doble de la anterior, esta es una velocidad convencional de bacterias consideradas de crecimiento rápido. Si los cálculos se realizan entre el momento del inóculo (aun cuando este proceda de un cultivo de 48 horas en condiciones óptimas) y la entrada en fase estacionaria, los valores de  $\mu$  llegan al orden de  $0.05 \text{ h}^{-1}$  lo que nos daría un tiempo aparente de duplicación de 13,25 horas. Parece que a densidades de población bajas la bacteria crece con dificultad y a medida que la población va siendo más densa alcanza velocidades de crecimiento convencionales o incluso considerablemente elevadas. Esta observación, aún cuando no disponemos de datos experimentales concluyentes, podría relacionarse con las observaciones con respecto a los modos de crecimiento. Desde el punto de vista experimental esta dificultad se resuelve con facilidad utilizando inóculos mucho más elevados procedentes de cultivos en fase logarítmica tardía y con volúmenes del 20 %. En cualquier caso averiguar las razones de esta diferencia aparente entre las velocidades de crecimiento es una línea a explorar en el futuro inmediato.

## 5.2. El modo de crecimiento

Con independencia de los valores de las tasas de duplicación. Es preciso señalar aquí que la bacteria, por sus propiedades biológicas que comentaremos con posterioridad crece en dos modos distintos.

Los aislamientos primarios crecen formando agregados que se adhieren con gran eficiencia a las paredes del tubo de cultivo y que les confieren un aspecto ciertamente peculiar (figuras 5.2.a y 5.2.b).

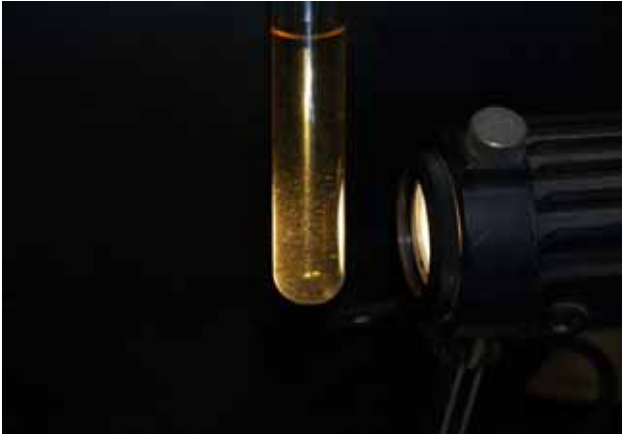


Fig. 5.2.a. Tubo de ensayo con crecimiento de la cepa AC 01.



Fig. 5.2.b. Tubo de ensayo con crecimiento de la cepa AC 02.

Esta propiedad que es general en los aislamientos primarios, en ocasiones se pierde originando cultivos que se comportan de modo Standard como lo hacen la mayoría de las bacterias Gram-negativas. Por el contrario ciertas cepas conservan esta propiedad a lo largo del tiempo. (Figura 5.2.c).

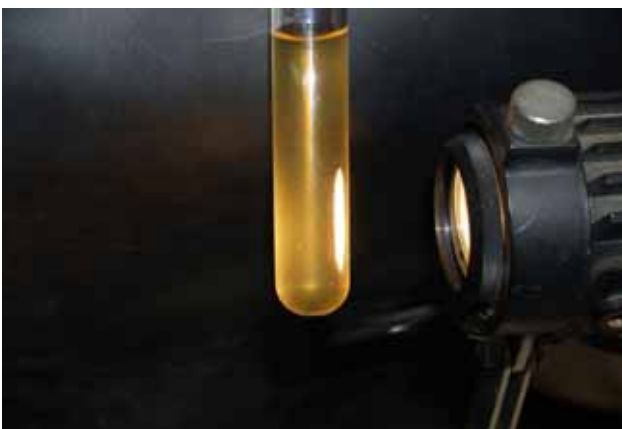


Fig. 5.2.c. Tubo de ensayo con crecimiento de la cepa LP 08.

La diferente morfología colonial o el distinto modo de crecimiento tienen consecuencias en propiedades biológicas de la bacteria que afectan no solo al modo de crecimiento sino también a ciertas propiedades del microbio, entre ellas la virulencia. A lo largo de este trabajo veremos que se da una relación considerable entre el modo de crecimiento y un buen número de características y potencialidades de la bacteria [198].

### 5.3. El crecimiento colonial de *A. actinomycetemcomitans*

El desarrollo de las colonias de *A. actinomycetemcomitans* presenta también aspectos dignos de interés que se han tratado en la introducción dado que a diferencia de las propiedades del crecimiento en medio líquido han sido considerablemente más estudiados. En principio las colonias de los aislamientos primarios de *A. actinomycetemcomitans* tienen como característica principal que tras incubaciones prolongadas (superiores a cinco o seis días) adquieren un aspecto característico dando origen a una formación estrellada en el centro de la colonia.

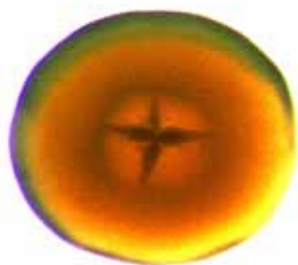


Fig. 5.3.a Típica morfología colonial de *A. actinomycetemcomitans*.

La Fig. 5.3. a., responde al arquetipo colonial característico de la especie. También se ha observado la pérdida de la propiedad de generar conformaciones estrelladas tras sucesivos cultivos en el laboratorio.

Por otra parte, tal como hemos señalado en la introducción, las cepas en cultivo tienden a segregarse en dos morfologías coloniales diferentes que pueden coexistir, a las que hemos denominado colonias arrugadas y variantes pequeñas (SCV). En las figuras 5.3.b y 5.3.c., se observan ambos tipos de morfología colonial vistos a la lupa binocular e iluminadas por transparencia. Como ya hemos comentado, tras sucesivos cultivos en el

laboratorio las cepas tienden, en general a perder esta propiedad, aunque en algunos casos la mantienen.

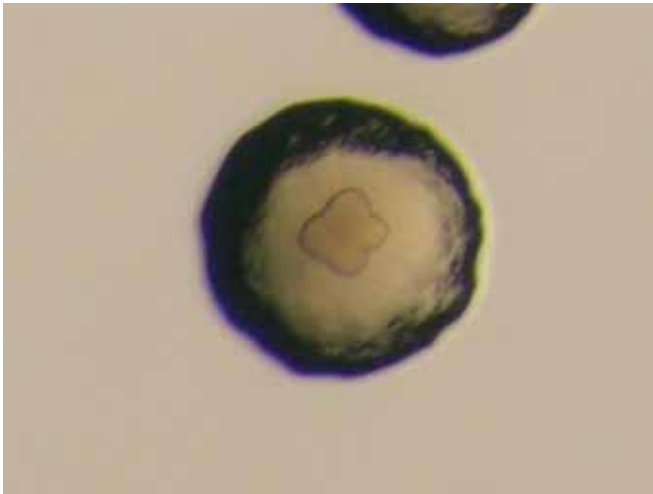


Fig 5.3.b Colonia de la cepa AC12 en la que se observa la formación central característica de las colonias de la especie estudiada.

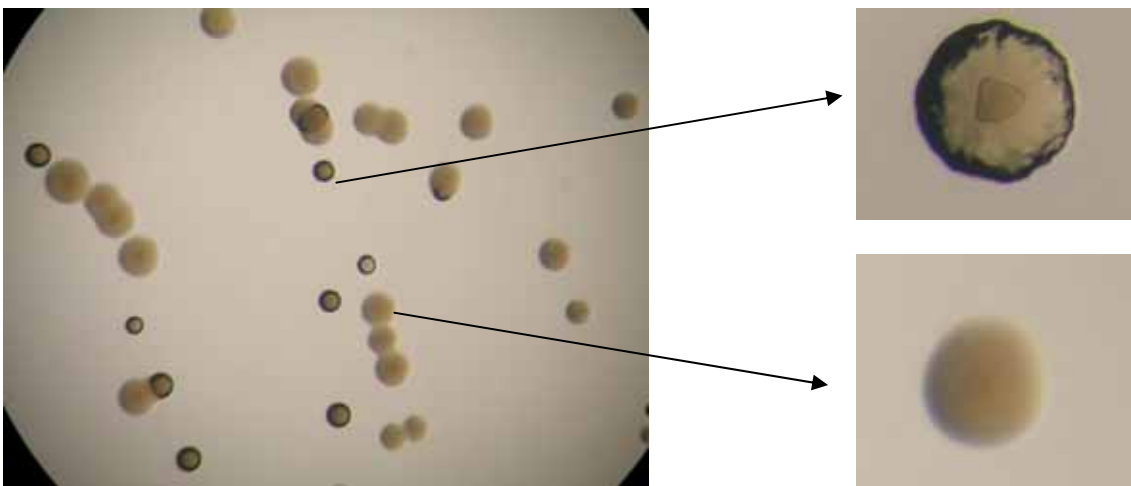


Fig 5.3.c Colonia de la cepa AC12 en la que se observa la doble morfología colonial característica

Como veremos a lo largo de este capítulo esta doble morfología colonial tiene importancia de cara a las propiedades de adhesividad de la bacteria así como a la posible susceptibilidad diferencial a los antimicrobianos.

Hemos observado que las cepas AC01, AC02, AC05, AC06, AC07 AC10 y AC14 , que son las que con más claridad dan un crecimiento aglutinado en medio líquido (Fig 5.2.a) coinciden con aquellas cuyas colonias responden a la morfología colonial típica de *A. actinomycetemcomitans*. (Fig 5.3.a).

## 5.4. La susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* a los antibióticos

### 5.4.1. MIC en medio líquido

Las tablas 5.4.1.a, b y c muestran los valores de MIC de todos los productos ensayados. En todos los casos, se remarcan las cepas que presentaron un crecimiento claramente aglutinado en medio líquido.

La tabla 5.4.1.a muestra los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de dos productos que habitualmente son buenos sustratos de las bombas de reflujo como son el bromuro de etidio y el cristal de violeta, y por otra parte, la del inhibidor de las propias bombas: carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) este valor se determina para asegurar que en los experimentos posteriores para poner de manifiesto la eventual capacidad de rebombeo, el antimetabolito se empleara a concentraciones que no afecten al crecimiento de la bacteria.

| CEPA  | BROMURO<br>ETIDIO | CRISTAL<br>VIOLETA | CCCP |
|-------|-------------------|--------------------|------|
| AC 01 | 8                 | 4                  | 0.5  |
| AC 02 | 4                 | 4                  | 0.5  |
| AC 03 | 4                 | 2                  | 0.5  |
| AC 04 | 8                 | 2                  | 0.5  |
| AC 05 | 8                 | 8                  | 0.5  |
| AC 06 | 16                | 8                  | 0.5  |
| AC 07 | 4                 | 8                  | 0.5  |
| LP 08 | 4                 | 16                 | 0.5  |
| AC 09 | 16                | 4                  | 0.5  |
| AC 10 | 4                 | 8                  | 0.5  |
| AC 11 | 4                 | 8                  | 0.5  |
| AC 12 | 16                | 16                 | 0.5  |
| LP 13 | 16                | 16                 | 0.5  |
| AC 14 | 4                 | 16                 | 0.5  |

Tabla 5.4.1.a. Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

El grupo de las fluoroquinolonas, que normalmente se emplean en estudios para la detección de la funcionalidad de las bombas de reflujo, se ensayó también para la

determinación de la susceptibilidad de todas las cepas utilizadas en este trabajo. Los resultados se indican en la tabla 5.4.1.b.

| CEPA  | CIPROFLOX. | A.NALIDIX. | NORFLOX. | OFLOX. |
|-------|------------|------------|----------|--------|
| AC 01 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 02 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 03 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 04 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 05 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 06 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 07 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| LP 08 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 09 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 10 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 11 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 12 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| LP 13 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |
| AC 14 | 0.00312    | 0.25       | 0.015    | 0.015  |

Tabla 5.4.1.b. Valores de MIC de las fluoroquinolonas

Finalmente se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de una representación significativa de los distintos grupos de antibióticos. Los resultados se muestran en la tabla 5.4.1.c.



| CEPA  | TET.  | ERITR. | CLRF | MET. | CLIND | AMPI. | AMOX | PEN. |
|-------|-------|--------|------|------|-------|-------|------|------|
| AC 01 | 0.25  | 16     | 0.25 | 0.5  | 1024  | 8     | 2    | 4    |
| AC 02 | 0.25  | 8      | 0.25 | 0.5  | 1024  | 8     | 2    | 4    |
| AC 03 | 0.25  | 4      | 0.25 | 0.25 | 1024  | 4     | 2    | 4    |
| AC 04 | 0.25  | 4      | 0.25 | 0.25 | 1024  | 8     | 4    | 2    |
| AC 05 | 0.5   | 4      | 0.5  | 0.5  | 1024  | 8     | 4    | 2    |
| AC 06 | 0.5   | 8      | 0.25 | 0.5  | 2048  | 1     | 2    | 1    |
| AC 07 | 0.25  | 4      | 0.25 | 0.5  | 1024  | 2     | 2    | 4    |
| LP 08 | 0.125 | 4      | 0.25 | 0.25 | 1024  | 8     | 2    | 2    |
| AC 09 | 0.5   | 4      | 0.25 | 0.5  | 1024  | 2     | 2    | 2    |
| AC 10 | 0.5   | 2      | 0.25 | 0.5  | 1024  | 2     | 2    | 4    |
| AC 11 | 0.5   | 4      | 0.5  | 0.5  | 1024  | 4     | 4    | 4    |
| AC 12 | 0.25  | 4      | 0.25 | 0.5  | 1024  | 8     | 2    | 8    |
| LP 13 | 0.25  | 2      | 0.25 | 0.5  | 2048  | 2     | 2    | 1    |
| AC 14 | 0.5   | 8      | 0.5  | 0.5  | 1024  | 2     | 1    | 4    |

Tabla 5.4.1.c Valores de MIC para distintos antibióticos

Como puede apreciarse de la lectura de los valores determinados en las tablas anteriores, en general puede considerarse que nos encontramos ante una especie bacteriana caracterizada por la susceptibilidad a la mayoría de los agentes antimicrobianos ensayados, aunque con algunas excepciones. Todas las cepas aparecen como considerablemente resistentes a la eritromicina y claramente resistentes a la clindamicina. Si bien se intentó amplificar por PCR los genes que codifican las metilasas que ordinariamente son el mecanismo que conduce a la resistencia a estos antibióticos, sin embargo no fuimos capaces de amplificar fragmentos susceptibles de estar implicados en esta resistencia. Dado que no entraba en los objetivos fundamentales de la tesis, la detección del posible mecanismo que opera en la resistencia a la clindamicina, este sigue siendo objetivo de investigación en nuestro grupo.

En las diferentes cepas ensayadas se observa también una baja susceptibilidad a la penicilina, que había ya sido descrita por otros autores [162]. Finalmente, es de señalar que en algunos casos, como el de las cepas AC06, AC09, AC12 y LP13, se observa una resistencia considerablemente elevada al bromuro de etidio así como al cristal de violeta. Aunque volveremos más adelante sobre ello es de destacar que la resistencia a

colorantes y a bromuro de etidio, en principio puede deberse únicamente a la capacidad para expulsar el tóxico fuera de los confines celulares o a la impermeabilidad de las envolturas celulares a estas moléculas. Esta observación esta en la base de las observaciones posteriores acerca de la existencia de un equipo de expulsión activo de tóxicos en esta especie bacteriana.

#### **5.4.2. MIC en medio sólido**

Los valores de susceptibilidad determinados sobre medio líquido que acabamos de comentar, pueden compararse con los que se determinan cuando las bacterias crecen en medio sólido, en el que el contacto con el antibiótico resulta mucho menos directo. Sin embargo, del análisis y comparación de los resultados entre los obtenidos por ambos métodos, no se aprecian diferencias que vayan más allá de uno o dos niveles de dilución, lo que ocurre con la mayoría de las bacterias Gram negativas. De hecho en las tablas 5.4.2 a, b y c, se han señalado aquellas cepas que muestran una aparente capacidad de autoaglutinación y no se ha detectado ninguna diferencia significativa en la distribución de los valores de sensibilidad disminuida al establecer relaciones entre la capacidad de autoaglutinación y los valores de susceptibilidad. Es decir, podría en principio afirmarse que nuestros datos no dan soporte a la idea de que los dos modos de crecimiento tengan una influencia decisiva en la susceptibilidad de la bacteria a los antibióticos.

| CEPA  | BROMURO<br>ETIDIO | CRISTAL<br>VIOLETA | CCCP |
|-------|-------------------|--------------------|------|
| AC 01 | 32                | 32                 | 2    |
| AC 02 | 4                 | 16                 | 2    |
| AC 03 | 8                 | 8                  | 2    |
| AC 04 | 16                | 4                  | 2    |
| AC 05 | 16                | 32                 | 2    |
| AC 06 | 32                | 32                 | 2    |
| AC 07 | 8                 | 16                 | 2    |
| LP 08 | 64                | 16                 | 2    |
| AC 09 | 64                | 4                  | 2    |
| AC 10 | 4                 | 16                 | 2    |
| AC 11 | 8                 | 16                 | 2    |
| AC 12 | 32                | 64                 | 2    |
| LP 13 | 64                | 16                 | 2    |
| AC 14 | 8                 | 32                 | 2    |

Tabla 5.4.2.a. Valores de MIC para tóxicos utilizando el método de dilución en agar

| CEPA  | CIPRO. | A.NALIDIX. | NORFLOX | OFLOX   |
|-------|--------|------------|---------|---------|
| AC 01 | 0.0125 | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 02 | 0.025  | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 03 | 0.0125 | 0.5        | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 04 | 0.025  | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 05 | 0.025  | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 06 | 0.025  | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 07 | 0.025  | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| LP 08 | 0.0125 | 0.5        | 0.03125 | 0.03125 |
| AC 09 | 0.0125 | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 10 | 0.0125 | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 11 | 0.0125 | 0.5        | 0.0625  | 0.03125 |
| AC 12 | 0.0125 | 1          | 0.0625  | 0.03125 |
| LP 13 | 0.0125 | 0.5        | 0.0625  | 0.0156  |
| AC 14 | 0.0125 | 0.5        | 0.0625  | 0.0156  |

Tabla 5.4.2.b. Valores de MIC para fluoroquinolonas

| CEPA  | TET. | ERIT. | CLRF | MET. | CLIND | AMPI. | AMOX | PEN. |
|-------|------|-------|------|------|-------|-------|------|------|
| AC 01 | 0.5  | 16    | 0.5  | 1    | 2048  | 16    | 4    | 8    |
| AC 02 | 0.5  | 8     | 0.5  | 1    | 2048  | 16    | 4    | 8    |
| AC 03 | 0.5  | 4     | 0.5  | 1    | 2048  | 4     | 2    | 4    |
| AC 04 | 0.5  | 8     | 0.5  | 1    | 2048  | 16    | 8    | 4    |
| AC 05 | 1    | 8     | 0.5  | 1    | 2048  | 16    | 4    | 8    |
| AC 06 | 0.5  | 16    | 0.5  | 1    | 2048  | 2     | 2    | 2    |
| AC 07 | 0.5  | 8     | 0.5  | 1    | 2048  | 4     | 2    | 8    |
| LP 08 | 0.5  | 4     | 0.5  | 1    | 2048  | 8     | 2    | 4    |
| AC 09 | 1    | 8     | 0.5  | 1    | 2048  | 4     | 2    | 2    |
| AC 10 | 0.5  | 4     | 0.5  | 1    | 2048  | 2     | 8    | 8    |
| AC 11 | 1    | 4     | 0.5  | 1    | 2048  | 8     | 8    | 8    |
| AC 12 | 0.5  | 8     | 0.5  | 1    | 2048  | 16    | 4    | 16   |
| LP 13 | 0.5  | 4     | 0.5  | 1    | 2048  | 2     | 2    | 2    |
| AC 14 | 0.5  | 8     | 1    | 1    | 2048  | 4     | 1    | 8    |

Tabla 5.4.2.c. Valores de MIC para todas las cepas ensayadas utilizando el método de dilución en agar

#### 5.4.3. Cálculo y comparación de las MIC con aglutinación bloqueada.

Si se comparan las concentraciones mínimas inhibitorias de los distintos antibióticos para las cepas estudiadas en condiciones en que la aglutinación está total o parcialmente bloqueada como consecuencia de que los tubos se incuben en agitación vigorosa, se obtienen unos valores de MIC que no difieren más de uno o como máximo dos niveles de dilución como se aprecia en las tablas siguientes (5.4.3.a, b, c y d). Esta observación iba en contra de una primera interpretación que consistía en que el modo de crecimiento podía afectar de modo considerable (o por lo menos significativo) los niveles de susceptibilidad.

| <b>ERITROMICINA</b> |               |                                   |
|---------------------|---------------|-----------------------------------|
|                     | <b>reposo</b> | <b>200 rpm.<br/>doble varilla</b> |
| AC 01               | 16            | 8                                 |
| AC 02               | 8             | 8                                 |
| AC 07               | 4             | 4                                 |
| LP 08               | 4             | 2                                 |
| LP 13               | 2             | 2                                 |
| AC 14               | 8             | 4                                 |

| <b>PENICILINA</b> |               |                                   |
|-------------------|---------------|-----------------------------------|
|                   | <b>reposo</b> | <b>200 rpm.<br/>doble varilla</b> |
| AC 01             | 4             | 1                                 |
| AC 02             | 4             | 2                                 |
| AC 03             | 4             | 2                                 |
| AC 04             | 2             | 2                                 |
| AC 05             | 2             | 2                                 |
| AC 06             | 1             | 0.5                               |
| AC 07             | 4             | 2                                 |
| LP 08             | 2             | 1                                 |
| AC 12             | 8             | 4                                 |
| LP 13             | 1             | 1                                 |
| AC 14             | 4             | 2                                 |

| <b>CIPROFLOXACINA</b> |               |                                   |
|-----------------------|---------------|-----------------------------------|
|                       | <b>reposo</b> | <b>200 rpm.<br/>doble varilla</b> |
| AC 01                 | 0.003         | 0.0015                            |
| AC 02                 | 0.003         | 0.0015                            |
| AC 07                 | 0.003         | 0.003                             |
| LP 08                 | 0.003         | 0.003                             |
| LP 13                 | 0.003         | 0.0015                            |
| AC 14                 | 0.003         | 0.0015                            |

| <b>CLINDAMICINA</b> |               |                                   |
|---------------------|---------------|-----------------------------------|
|                     | <b>reposo</b> | <b>200 rpm.<br/>doble varilla</b> |
| AC 01               | 1024          | 512                               |
| AC 02               | 1024          | 1024                              |
| AC 07               | 1024          | 512                               |
| LP 08               | 1024          | 1024                              |
| LP 13               | 2048          | 1024                              |
| AC 14               | 1024          | 1024                              |

Tablas 5.4.3 a, b, c, y d. Comparación de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de los distintos antibióticos ensayados en condiciones normales y en condiciones de inhibición de la

aglutinación en medio líquido. Las cepas remarcadas presentaron un claro crecimiento aglutinado en medio líquido sin agitación.

Estos valores confirman que la influencia de la capacidad de aglutinación sobre el valor mínimo capaz de inhibir el crecimiento visible es despreciable o muy leve. Sin embargo en ocasiones los valores de *MIC* (que se leen en este caso tras 48 horas de incubación) son únicamente un valor de referencia, aunque en realidad la historia del cultivo debe interpretarse bajo otro prisma. Es de sobras conocido que la presencia de inhibidores de las bombas de reflujo no siempre tiene como consecuencia la detección de modificaciones en los valores de *MIC*. También se ha visto en numerosas ocasiones que las modificaciones de la permeabilidad que producen una reducción drástica de la capacidad de los antibióticos para penetrar la bacteria, tienen muy poco o nulo efecto sobre los valores de *MIC*. Sin embargo a tiempos cortos estos fenómenos pueden alterar de modo notable el comportamiento de la bacteria en presencia del antimicrobiano.

#### **5.5. Análisis de las proteínas de membrana externa por electroforesis en geles SDS-PAGE.**

La membrana externa de *A. actinomycetemcomitans* visualizada en geles de poliacrilamida con SDS presenta diversas proteínas resistentes a la solubilización por SDS en su membrana externa. Destacan por su nivel de expresión, y corroborando los resultados de estudios previos, [199] [200], en nuestras cepas, las OMP denominadas según sus pesos moleculares estimados como Omp 100, Omp 55, Omp 39, Omp 34 , Omp 29 , Omp 18-16 kDa respectivamente. (Figura 5.5.a.). Comparando los resultados entre los carriles *a* (muestras hervidas a 100°C) y *b* del gel (muestras sin hervir), podemos ver que todas exceptuando Omp 34 y Omp 29, presentan el mismo comportamiento dinámico a través del gel desnaturalizante, bandeando a la misma altura, lo que nos lleva a pensar que su conformación natural en la célula es monomérica, ya que si fuera al contrario, durante el tratamiento a 100°C la estructura cuaternaria original se desharía debido al tratamiento por calor, corriendo a través del gel como monómeros y viéndose en definitiva diferencias de bandeo con respecto a la forma polimérica que correría por el carril *b* (tª ambiente).

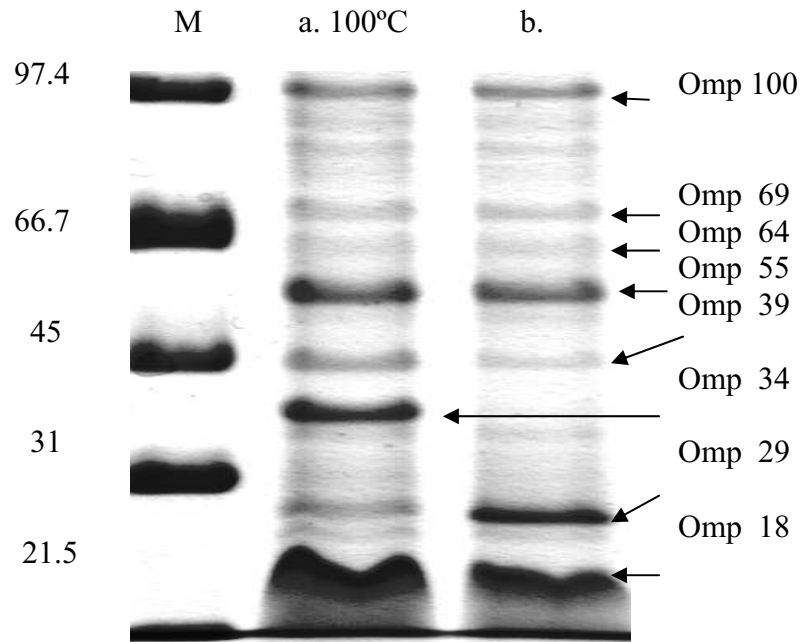


Fig 5.5a Imagen que muestra un gel de poliacrilamida con las proteínas de la fracción de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*. M: marcador de peso molecular. Carril a: proteínas calentadas previamente a 100 °C durante 5 minutos. Carril b: sin tratamiento térmico previo

En el caso de Omp 34 y Omp 29, la explicación es completamente distinta. Según han descrito diversos autores [14], las dos bandas de 34 y 29 kDa corresponden a una misma proteína cuyo comportamiento electroforético es diferente. Se trata de una proteína cuya estructura es modificable por calor (mediante el tratamiento a 100°C) pero no se debe a la escisión de monómeros sino a la relajación de su especial estructura superenrollada después del tratamiento, que provoca que corra menos. Veríamos Omp34 como la forma relajada y Omp 29 como la forma más enrollada sin hervir. Mediante otra serie de experimentos se ha comprobado por parte de los mismos autores que pertenece a la familia de proteínas de membrana externa denominadas genéricamente como Omp A y descritas inicialmente en *E. coli*, ya que presenta una homología significativa en la secuencia de su extremo N-terminal.

#### 5.5.1. La porina de *A. actinomycetemcomitans*

La proteína Omp39 se pudo purificar a partir de geles de poliacrilamida por excisión y elución de la proteína, con lo que se obtienen preparaciones altamente purificadas. La figura 5.5.1., muestra la imagen del gel de poliacrilamida con SDS obtenido después del citado proceso.

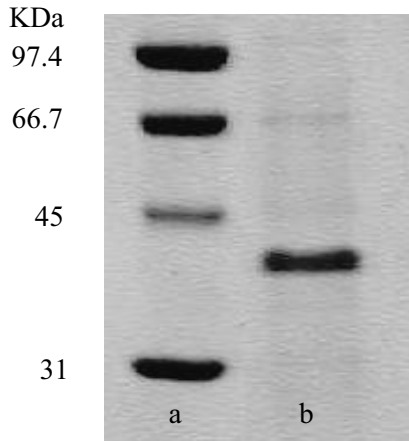


Fig. 5.5.1. Gel de poliacrilamida de una preparación purificada de Omp39. Carril a: marcador de peso molecular. Carril b: proteína purificada.

### 5.6. Medida de la conductancia de canal simple (*conductance in black lipid bilayer technique*) de Omp 39

Para comprobarla, utilizamos la técnica de *black lipid planar bilayer*, que es un procedimiento de medida de la conductividad de iones a través de bicapas lipídicas artificiales descrito previamente por otros autores [191]. Añadiendo una solución concentrada de Omp 39 purificada, en una solución con detergentes a uno o ambos lados de la membrana, se observan incrementos de la conductancia. Cada incremento discreto es el resultado de la incorporación de un canal nuevo que abre una vía de paso de iones a través de la bicapa.

La figura 5.6.a muestra un ejemplo de un fragmento de un registro en el que se pueden apreciar los incrementos discretos de conductividad a medida que se van incorporando unidades protéicas a la bicapa artificial formada en la celda del equipo. Como ocurre en muchos casos la dispersión aparente de los valores es considerable. En general se asume que el valor que se presenta con mayor frecuencia corresponde a la conductancia de canal simple, mientras que aquellos escalones cuyo valor se aparta del más frecuente corresponderían a incorporaciones de múltímeros o agrupaciones defectivas o incluso de agregados capaces de formar un mayor número de poros.

Tampoco es descartable que en el proceso de purificación se hayan arrastrado pequeñas proporciones de otras proteínas con capacidad real de formación de canales. Para resolver con mayor fidelidad estos valores se recurre al recuento de un número elevado de canales y a la construcción de un histograma de frecuencias (o de probabilidades)



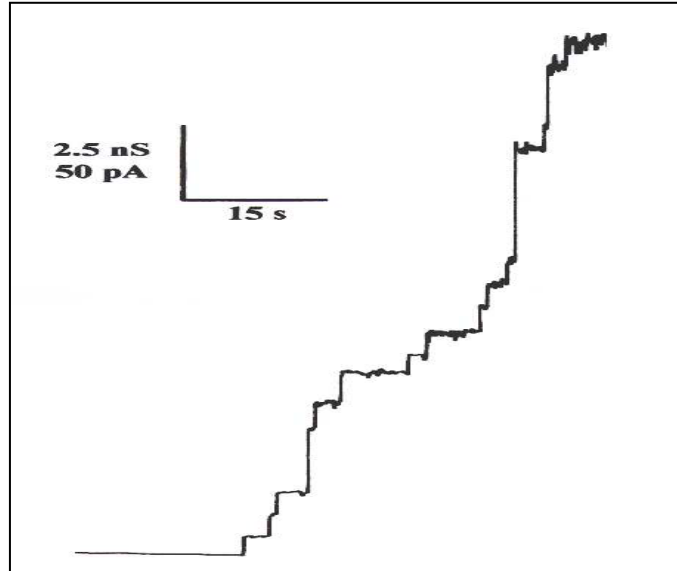
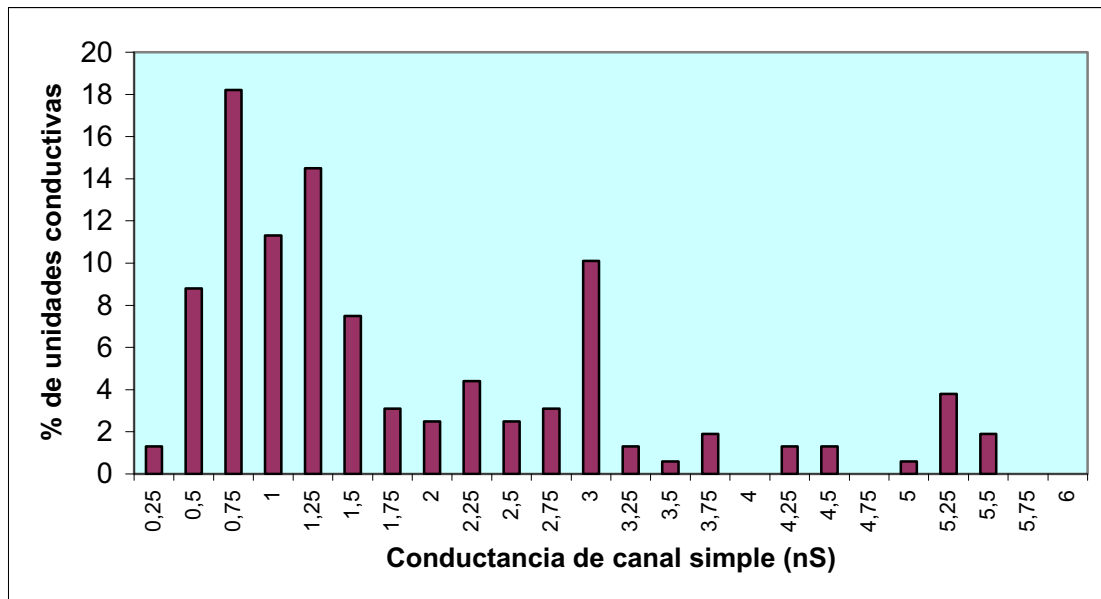


Fig 5.6.a. Registro de conductancia de canales simples de la porina de *A. actinomycetemcomitans* LP08. La fase acuosa contenía 1 M KCl. El experimento se realizó a temperatura ambiente.

Estos registros se representan posteriormente en forma de histogramas que muestran las frecuencias (en porcentaje) de conductancia de la proteína Omp 39 reconstruida en una membrana de difitanoi fosfatidilcolina/ n- decano. La solución acuosa fue variándose en cada uno de los experimentos. Así como la concentración molar de la sal escogida. El voltaje aplicado fue de 20mV a temperatura de 20°C.

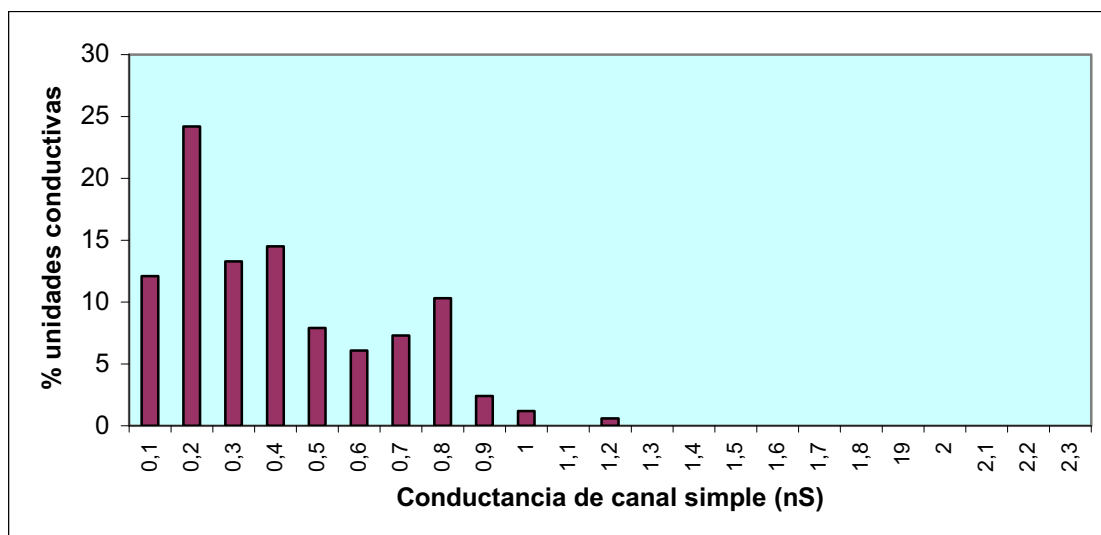
La figura 5.6.b muestra un diagrama de frecuencias (en porcentaje) correspondiente a los canales formados por la proteína Omp39 en una bicapa lipídica de difitanoi fosfatidilcolina disuelto en n-decano con aplicación de un potencial de 10 mV y en presencia de KCl 1 M.



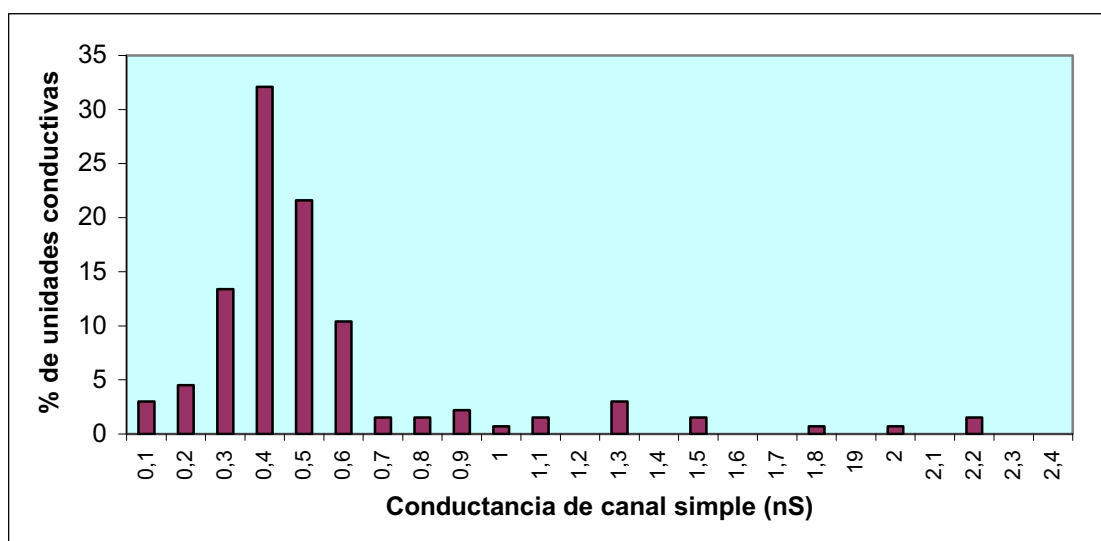
**Figura 5.6.b.** Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membranas DiPhPc/n-decano, en presencia de aproximadamente 10 ng/ml de la proteína Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans*. La solución acuosa contenía KCl 1 M pH7.

Puede apreciarse claramente que la mayor frecuencia corresponde a un valor de conductancia de 750 pS y que los valores de 3 y de 1,5 son también máximos de frecuencia. El valor de 1.25 que constituye también un máximo es un factor de distorsión en la medición del tamaño de poro generado por Omp39. Las medidas realizadas en presencia de otras sales y de otras concentraciones de cloruro y de potasio pueden contribuir a reforzar esta primera medición.

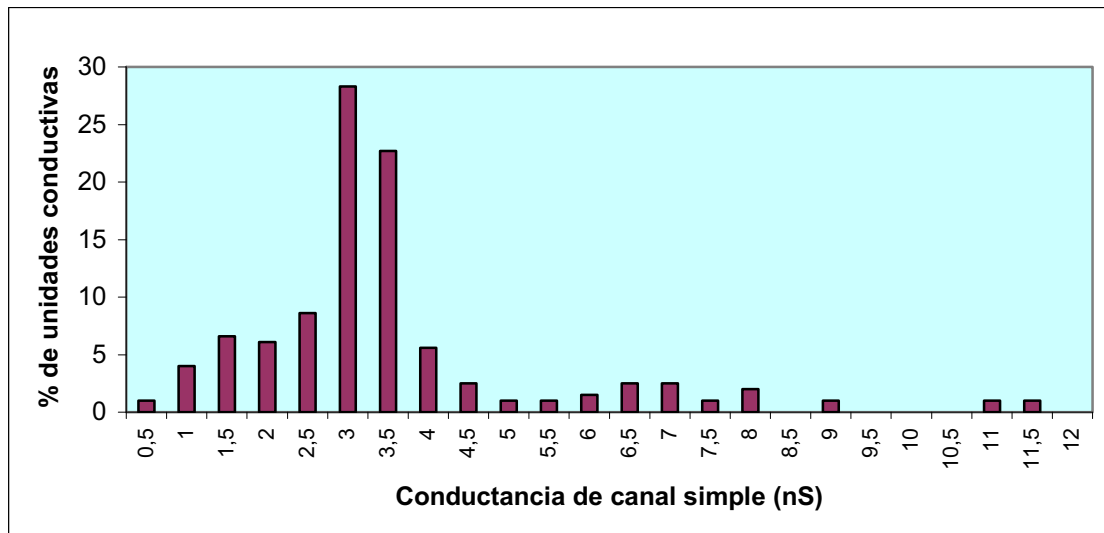
Las figuras 5.6.c, d y e muestran los correspondientes diagramas de frecuencias para la proteína Omp39 en presencia de KCl 0.1 M, 0.3 M y 3 M respectivamente. Obviamente una concentración menor de iones comporta medida de conductancia de valores inferiores. Los tres máximos son en este caso 200, 400 y 3000 pS.



**Figura 5.6.c** Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membranas DiPhPc/n-decano, en presencia de aproximadamente 10 ng/ml de la proteína Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans*. La solución acuosa contenía KCl 0.1M pH7.

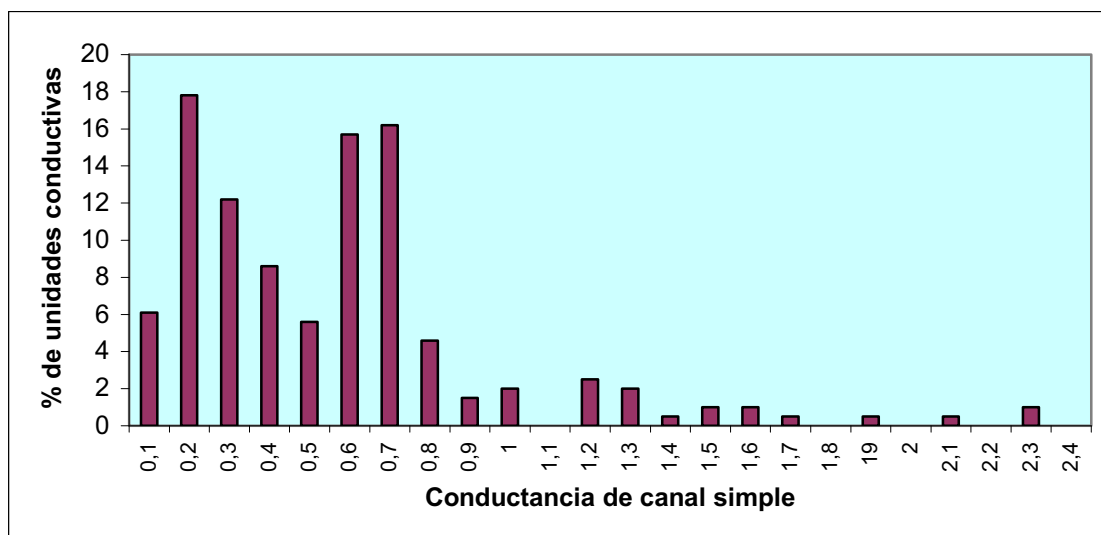


**Figura 5.6.d** Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membranas DiPhPc/n-decano, en presencia de aproximadamente 10 ng/ml de la proteína Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans*. La solución acuosa contenía KCl 0.3 M pH7.

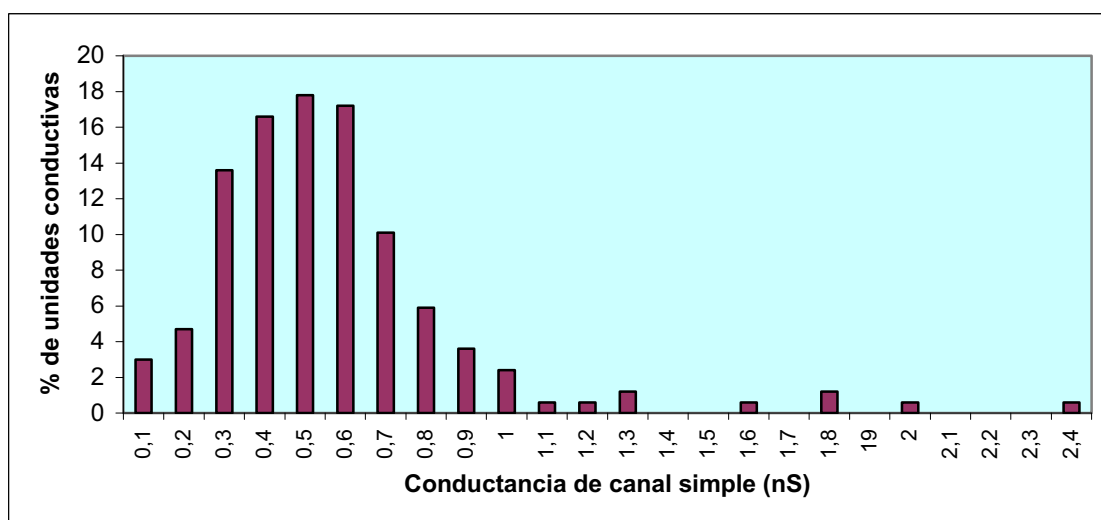


**Figura 5.6.e** Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membranas DiPhPc/n-decano, en presencia de aproximadamente 10 ng/ml de la proteína Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans*. La solución acuosa contenía KCl 3 M pH 7.

Las medidas realizadas con otras sales se exponen en las figuras 5.6.f y 5.6.g. Cuando se utiliza el acetato potásico 1 M se obtiene un máximo de conductancia de 0.2 nS (200pS). Dado que en este experimento el catión es el potasio y la concentración es 1 M, la conductancia debida al paso de cationes a través de los canales es equivalente al que hemos observado en la grafica 5.6.c. La diferencia aquí reside en que el anión acetato es de tamaño muy superior al ión Cl, con lo que atraviesa los canales con mucha mayor dificultad.



**Figura 5.6.f** Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membranas DiPhPc/n-decano, en presencia de aproximadamente 10 ng/ml de la proteína Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans*. La solución acuosa contenía Acetato potásico 1 M pH 7.



**Figura 5.6.g** Histograma de todas las unidades conductivas observadas en membranas DiPhPc/n-decano, en presencia de aproximadamente 10 ng/ml de la proteína Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans*. La solución acuosa contenía LiCl 1 M pH 7.

La tabla 5.6.h., muestra un resumen de los resultados de conductancia obtenidos. En este caso, las membranas también se formaron a partir de 1% de difitanoil fosfatidilcolina disuelto en n-decano, a una temperatura de 20°C. El pH de las soluciones acuosas de las sales fue aproximadamente de 6 excepto si se indica lo contrario. G representa la media de conductancia calculada a partir de N poros conductivos, para cada solución.

|          | Concentración<br>(M) | Nº de poros | Conductancia<br>G (nS) |
|----------|----------------------|-------------|------------------------|
| KCl      | 0.1                  | 165         | 0.2                    |
| KCl      | 0.3                  | 134         | 0.4                    |
| KCl      | 1                    | 126         | 0.75                   |
| KCl      | 3                    | 198         | 3                      |
| KAc pH 7 | 1                    | 197         | 0.2 / 0.7              |
| LiCl     | 1                    | 169         | 0.5                    |

Tabla 5.6.h. Conductancia de canal simple observada de la porina Omp39 de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans* medida con diversas soluciones de sales y a diferentes molaridades.

Si atendemos a la selectividad de los canales formados por Omp39 podemos observar algunos datos que sugieren que los canales son moderadamente selectivos para los aniones, es decir conducen mejor los cationes. En los experimentos de canal simple en los que el ión  $K^+$  es reemplazado por el  $Li^+$ , menos móvil, (Figura 5.6.g), la conductancia de canal simple se reduce de 750 pS a 500 pS. Cuando se utiliza el acetato potásico (figura 5.6.f), cambiamos el anión  $Cl^-$  (móvil) por el acetato (mucho menos móvil) en este caso la reducción es de 700 pS a 200pS una reducción mucho mayor que en el caso anterior con otro máximo a 700.

Por otra parte también pueden concluirse algunas otras características de la porina de *A. actinomycetemcomitans*. Se puede observar fácilmente que la conducción de iones de las distintas sales utilizadas en los experimentos siguen una secuencia de movilidad que se corresponde con sus características. Por ejemplo si se comparan las conductancias generadas por una única sal en función de su concentración (figura 5.6.i) se da una relación lineal entre conductancia de canal simple y concentración de iones en la célula. Ello es consistente con la asunción de que el canal formado por Omp39 es en realidad un canal lleno de agua por el que circulan los iones de modo libre (sin que juegen papel

algunos hipotéticos ligandos). De hecho esta idea se intuye ya del estudio de los experimentos iniciales en presencia de 1M de KCl. El hecho de que exista una relación lineal ente concentración de sal y conductancia de canal simple es general en las porinas inespecíficas de las Enterobacterias y especies relacionadas [201].

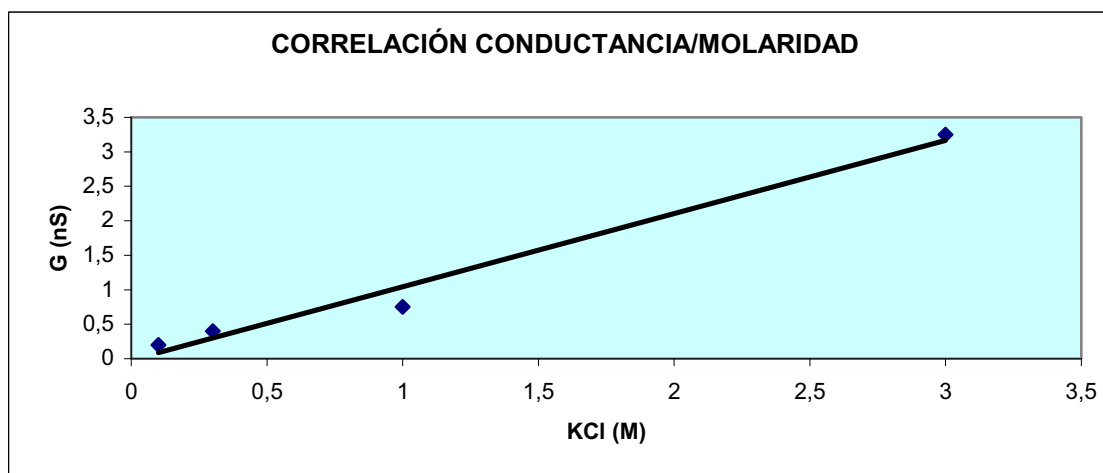


Figura 5.6.i. Correlación entre la molaridad de la solución y la conductancia observada a través de los canales formados por Omp 39.

### 5.6.1. Estimación del diámetro de canal formado por Omp 39.

Con toda la serie de experimentos anteriores, se obtuvieron registros discretos de conductancia que corresponden a la formación de un canal de porina Omp39. El diámetro del poro que forma la proteína puede estimarse suponiendo iguales las movilidades relativas de los diferentes iones utilizados tanto en solución acuosa como en el interior del poro. Así, la conductancia ( $G$ ) puede utilizarse para estimar el diámetro de canal que forma la porina, según la ecuación siguiente.

$$G = p \cdot \pi \cdot r^2 / l$$

Siendo  $p$ : conductancia de la fase acuosa, compuesta por KCl 1 M (110mS/cm).

Asumimos que el poro se encuentra lleno de la misma fase acuosa del medio y que además es cilíndrico, con una longitud transmembrana  $l$  de 6nm (aproximadamente el grosor de una membrana plasmática).

Aplicando la ecuación anterior, y considerando la media de conductancia de 0.75nS en KCl 1 M para los canales de la proteína Omp 39, tenemos que el diámetro ( $d = 2r$ ) del poro que forma es de 0.73 nm.

### **5.7. Búsqueda de integrones de clase I en las cepas de *A. actinomycetemcomitans***

Se buscó amplificar por PCR utilizando los cebadores descritos en el apartado 4.11.2.2., [197] las regiones conservadas flanqueantes a los integrones de clase I, susceptibles de albergar genes que pueden conferir resistencia fenotípica a grupos variados de antibióticos. No se obtuvo ninguna amplificación en comparación con el obtenido para el control positivo, para el que se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* P1, con la que se está trabajando actualmente en nuestro laboratorio.

### **5.8. Búsqueda de plásmidos de gran tamaño en las cepas de *A. actinomycetemcomitans***

Basándonos en la utilización de electroforesis de campo pulsante (*PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis*), buscamos encontrar y separar moléculas de DNA de tamaño superior a 20 Kb, con el fin de encontrar plásmidos de gran tamaño que hipotéticamente pudieran contener genes de resistencia. El procedimiento seguido [16], nos llevó a comprobar, en comparación con los controles positivos utilizados (*E. coli*, conteniendo un *pUC19* y *M. morgani* HUB 198351, que presenta un plásmido de resistencia, estudiado en nuestro laboratorio), que las cepas de *A. actinomycetemcomitans* utilizadas en este trabajo, no presentan grandes plásmidos.

### **5.9. Demostración de la capacidad de reflujo en *A. actinomycetemcomitans*.**

Los experimentos de interrupción del reflujo por adición de CCCP una vez iniciada la acumulación de antibiótico cuando se utilizó ciprofloxacina no permitieron visualizar diferencias entre las suspensiones tratadas con el inhibidor metabólico de aquellas que no incorporaban el antimetabolito. En principio, aparentemente parecía que en la especie no se detectaba fisiológicamente ninguna bomba de reflujo funcional que fuera inhibible por CCCP. Posiblemente este resultado se debió a la susceptibilidad extrema de la bacteria a la ciprofloxacina. Por ello se abordó experimentalmente la comprobación de la presunta existencia de bombas de reflujo por una estrategia diferente que se ha descrito en los apartados 4.7.2 y 4.7.3 cuyos resultados se exponen a continuación:



### 5.9.1. Ensayos de inhibición del crecimiento. Reflujo de Bromuro de Etidio.

La inhibición de la presunta bomba de reflujo por CCCP, produce un incremento espectacular de la susceptibilidad al colorante Bromuro de etidio como puede desprenderse del análisis de los datos que resume la gráfica de la figura 5.9.1.

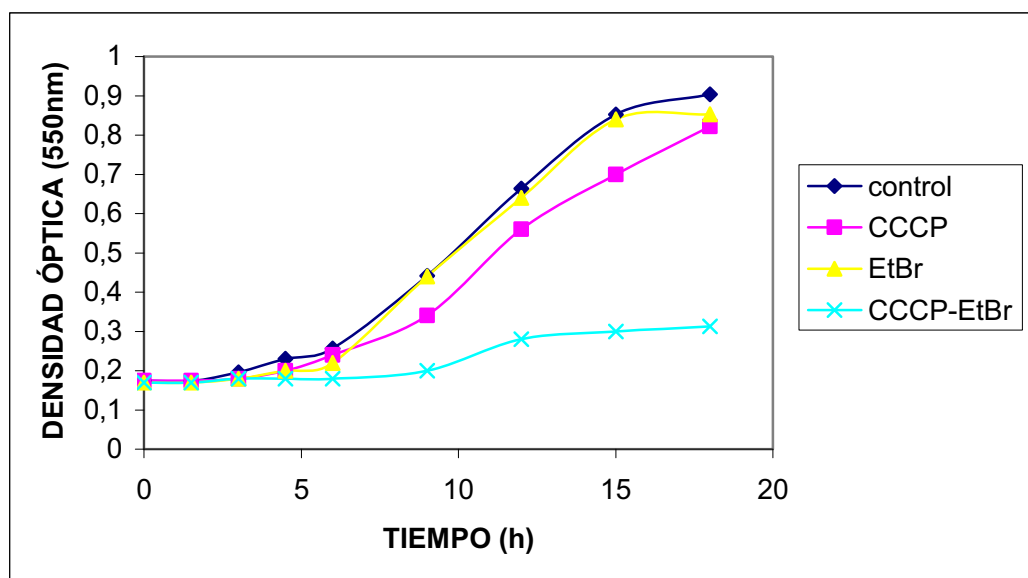


Fig. 5.9.1. Crecimiento de la cepa LP08 de *A. actinomycetemcomitans* en presencia del colorante bromuro de etidio, CCCP y ambos.

Resultados similares se obtienen cuando se ensaya cristal de Violeta, SDS, y algunos antibióticos que podrían ser substratos de las bombas de reflujo como la ciprofloxacina o la ampicilina.

### 5.9.2. Efecto de la concentración de antimicrobianos sobre el crecimiento bacteriano, en presencia y ausencia de CCCP

Para corroborar los resultados obtenidos gracias a los ensayos de inhibición del crecimiento expuestos en el apartado anterior, se realizaron una serie de experimentos para comparar el efecto de la concentración de diferentes antimicrobianos sobre el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* LP08 en presencia del inhibidor metabólico CCCP y en su ausencia.

Como puede observarse en las figuras 5.9.2.a, b, c y d, *A. actinomycetemcomitans* LP08 es mucho más sensible a incrementos en la concentración de Bromuro de etidio,

ampicilina, ciprofloxacina y cristal de Violeta respectivamente cuando se incubaba en presencia del inhibidor metabólico CCCP, que cuando no es así, demostrándose una vez más la actuación de una posible bomba de reflujo que el CCCP inhibiría en los casos en que es utilizado.

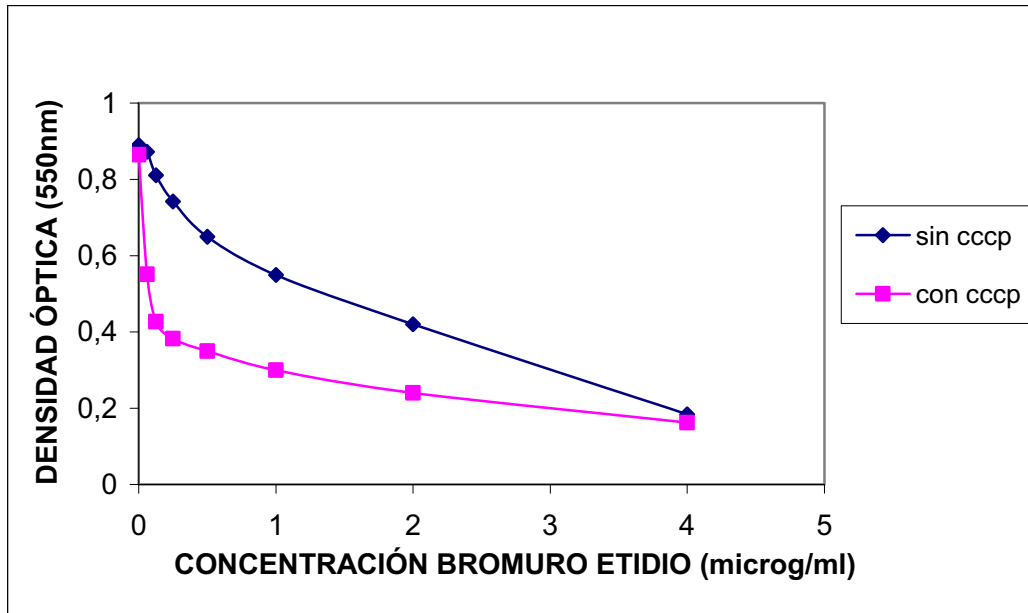


Fig 5.9.2.a. Efecto de la concentración de Bromuro de Etidio sobre el crecimiento de LP08 en presencia y ausencia de CCCP.

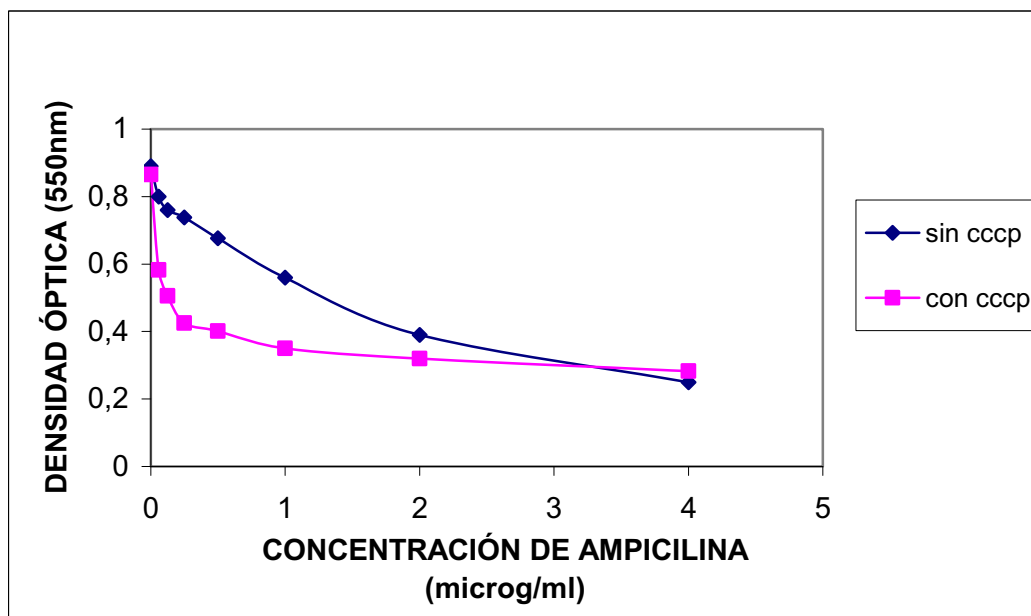


Fig 5.9.2.b. Efecto de la concentración de ampicilina sobre el crecimiento de LP08 en presencia y ausencia de CCCP.

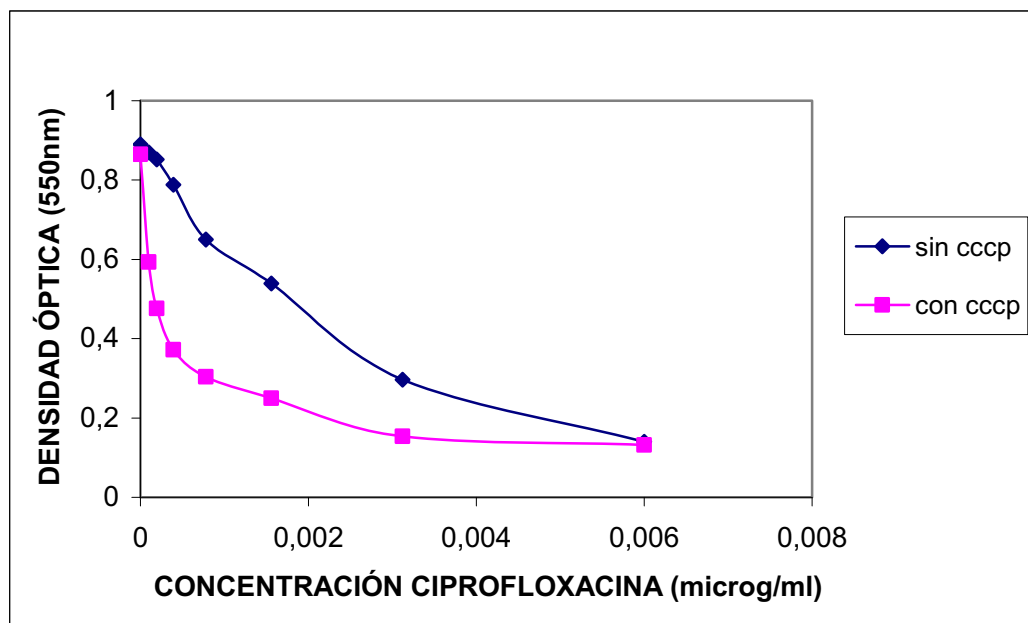


Fig 5.9.2.c. Efecto de la concentración de ciprofloxacina sobre el crecimiento de LP08 en presencia y ausencia de CCCP.

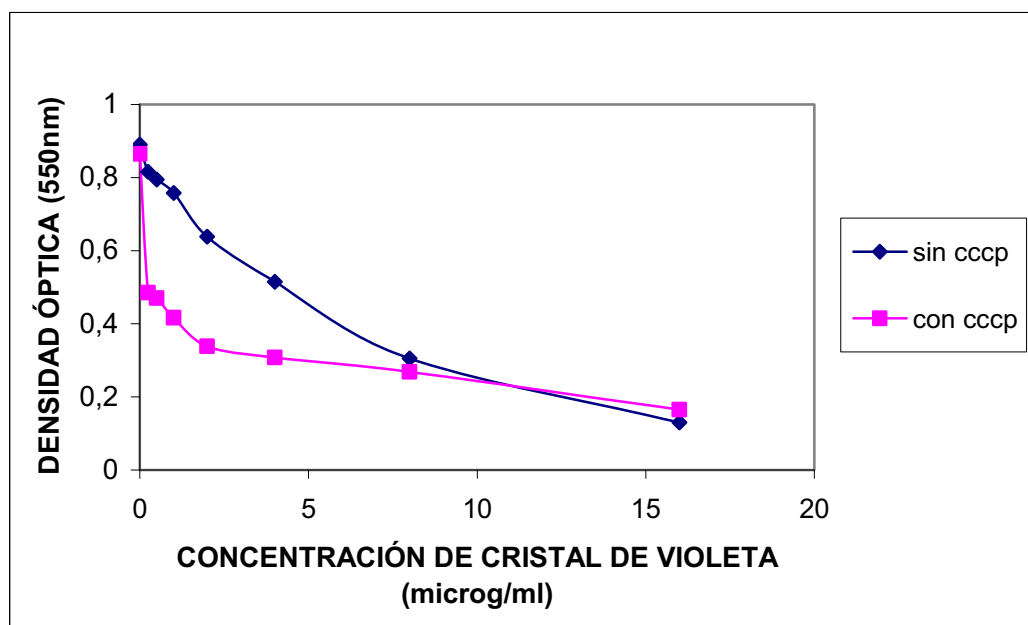


Fig 5.9.2.d. Efecto de la concentración de cristal de violeta sobre el crecimiento de LP08 en presencia y ausencia de CCCP.

A partir de la demostración experimental de que nos encontrábamos ante una bacteria cuya capacidad de expulsión activa de productos nocivos era fenotípicamente demostrable, procedimos a utilizar los cebadores para PCR que se utilizaron ya en

nuestro laboratorio para amplificar los genes del sistema *acrAB* en *Haemophilus influenzae* [196].

### 5.9.3. Amplificación de la región *acrAB*

La figura 5.9.3 muestra los fragmentos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores *hacrR-up* i *hacrB-up*.

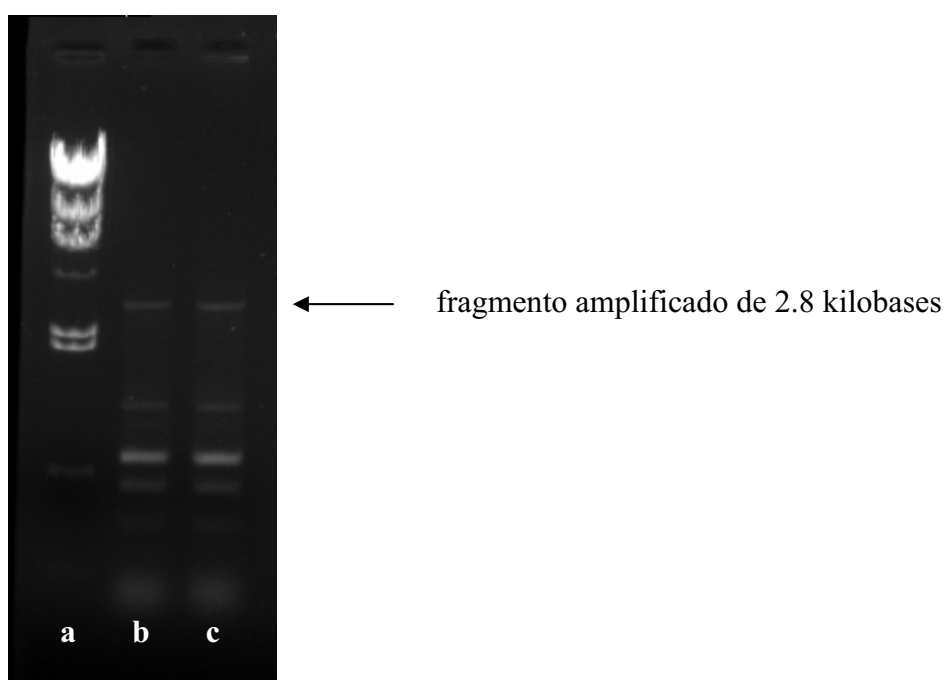


Figura 5.9.3. Gel de agarosa al 0.7% de los productos de PCR amplificados.

Carril a: Marcador de peso molecular marcador  $\lambda$ HindIII.

Carril b: amplificones obtenidos de la cepa control *H. influenzae* Rd 31517ATCC.

Carril c: amplificones obtenidos a partir de la cepa LP 08 de *A. actinomycetemcomitans*.

### 5.9.4. Secuenciación del gen *acrAB* de *A. actinomycetemcomitans*

El producto de la reacción empleado fue el fragmento de 2.8 kilobases que codifica la secuencia completa de los genes *acrR*, el gen regulador, y el primer gen estructural *acrA*. Además contiene una parte del gen *acrB*, situado inmediatamente después del gen *acrB* en la secuencia genómica de *A. actinomycetemcomitans*.

En la figura 5.9.4.a se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos correspondiente a la parte del amplicón que codifica el gen regulador *acrR*.

```

1      atgcgacaagctaaaacagacttagctgaacagatTTTTTcagcgacagatcgTTTaatg
      M R Q A K T D L A E Q I F S A T D R L M
61     gcaagagaagggttgaatcaacttctatgctcaaacttgCGaaagaagcaaatgtagcc
      A R E G L N Q L S M L K L A K E A N V A
121    gcaggaacgatttacctttatttttaaaaacaaagatgaattgcttgaacaatttgcacac
      A G T I Y L Y F K N K D E L L E Q F A H
181    agagtgttttcaatgTTTatggcaacacttgaaaaagatTTTgatgaaactaagcctttt
      R V F S M F M A T L E K D F D E T K P F
241    TTCgaacagtatcgacaaatgtggaaaaacatttggTatttcttacaagaaaatcccact
      F E Q Y R Q M W K N I W Y F L Q E N P T
301    attctatccaatttaaagcaatatgaatcTTTgCCgaatttcaaggatatttgTaaaaaac
      I L S N L K Q Y E S L P N F K D I C K N
361    attaaaaattgccgttgggatttattttgtcatcaagcacaaaaagctggcTTattagcg
      I K N C R W D L F C H Q A Q K A G L L A
421    gaattatctgaagatatttctTTTTattaagTTTgaaaacggcgataaatttagcctct
      E L S E D I L F L L S L K T A I N L A S
481    gatgcaaaatttatcgatttTcgatcTTaagcctgaaattttagaatctgtgattgaacgc
      D A K F I D F D L K P E I L E S V I E R
541    tcttggcgtgCGattcagaaaTaa
      S W R A I Q K -

```

Figura 5.9.4.a. Secuencia de *acrR*

La Fig. 5.9.4.b se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos correspondiente a la parte del amplicón que codifica el gen estructural *acrA*.

```

1      atgaaaataatttttagtggtattttgtcTTaatttttTgTcggtgtcatcggttttaatatg
      M K I I L V V F V L I F V G V I G F N M
61     ataaaaggcgtaatgataagccgagccattgcaggaatgccagaatcttcaagcccagta
      I K G V M I S R A I A G M P E S S S P V
121    accgcacttgaagttcaaccgCGtgatggacgCCagttattaacacaacaggtcTTgtg
      T A L E V Q P R E W T P V I N T T G L V
181    cgtccaaatcaaggcgcaatgctcagTacaacaaaatgCGggcgCGgtttcacaagtactt
      R P N Q G A M L S T Q N A G A V S Q V L
241    gttcaaaatggacaaaatgtgaaaaaaggtgaggtgcttTgtggagcttgatagttctgtt
      V Q N G Q N V K K G E V L V E L D S S V
301    gaacgagctaattcacaagctgctcaggcacaattatcagcacttCGTcaaacttaccaa
      E R A N L Q A A Q A Q L S A L R Q T Y Q
361    cgTtatgtgggtttattaaatagcaatgctgtatcacgtcaagaaatggataacgcaaaa
      R Y V G L L N S N A V S R Q E M D N A K
421    gcggcttatgatgctcaagtagctagtattgaatctctaaaagcagcaattgaacgtcgt
      A A Y D A Q V A S I E S L K A A I E R R
481    aaaattgttgcgCattttgatggcaaaagcaggtattTgtgaaaatcaatgTTggacaatat
      K I V A P F D G K A G I V K I N V G Q Y
541    gtgaatgttggaaacagaaattgtgCGgtgtagaagatactagctcaatgaaagtggatttt
      V N V G T E I V R V E D T S S M K V D F

```

```

601   gctctttcacaaaatgatttagataaattacatatcggtcagcgcggttacagcgacaaca
      A L S Q N D L D K L H I G Q R V T A T T
661   gatgctcgcgttgggcgaaacattttcagctcgaatcactgcgattgaacctgccattaat
      D A R L G E T F S A R I T A I E P A I N
721   tcatcaacagggttttagttgatgttcaggctacttttgatcctgaagatgggcataaattg
      S S T G L V D V Q A T F D P E D G H K L
781   ctttcagggtatgttctctcgttacgcattgcacttccaactgaaacaaatcaagttgct
      L S G M F S R L R I A L P T E T N Q V V
841   gttccacaagtagctattagctacaatatgtatggcgaaattgcctatttacttgaacca
      V P Q V A I S Y N M Y G E I A Y L L E P
901   ttatctgaagaagaaaaaggaaaaatgtcaggtaatgaaaaattggatcgtctctatcgt
      L S E E E K G K M S G N E K L D R L Y R
961   gcgaaacagatcacccgtatttactaaagatcgtcaagggtgtttatgctcaattacagggg
      A K Q I T V F T K D R Q G V Y A Q L Q G
1021  aatgaagttaaagtgggagataaaaattattacaggcggtcagcaaggatttggtaatgga
      N E V K V G D K I I T G G Q Q G I G N G
1081  agtcttggtgaatggattaaaaaagacattgtgggtgcaatagagcctgcacataaaaca
      S L V E W I K K D I V G A I E P A H K T
1141  ccactttaa
      P L -

```

Fig. 5.9.4.b. Secuencia de *acrA*

Finalmente en la figura 5.9.4.c se muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos correspondiente a la parte del amplicón que codifica el gen estructural *acrB* completada desde el lugar de recombinación con el cebador con la secuencia correspondiente de *H. influenzae* [196].

```

1     atgtatgaggaaaatccgaatgaaatttaccgatataatatttcgctcgtcctgtttttagca
      M Y E E I R M K F T D I F I R R P V L A
61   gtttcaattagtttgtaatgattattttaggggttgcaagcaatctcgaaattggcagtg
      V S I S L L M I I L G L Q A I S K L A V
121  cgtgaataccctaaaatgactactacagtcattacagtgagtaccgcatatccaggggca
      R E Y P K M T T T V I T V S T A Y P G A
181  gatgccaatttaaatccaagcatttgttacgtcaaaattggaagaatctatcgcgcaagcc
      D A N L I Q A F V T S K L E E S I A Q A
241  gataaatattgattatatgtcttcgactagtgcgcctagtagttcgactattacaataaaa
      D N I D Y M S S T S A P S S S T I T I K
301  atgaaattaaataccgatcctgcaggcgcggttagcagatgtgtagccaaagtgaatgca
      M K L N T D P A G A L A D V L A K V N A
361  gtaaagtcagcattaccaaattggtattgaagatcctagtgatcctcttcttcagggtggg
      V K S A L P N G I E D P S V S S S G G
421  agcgggtattatgtatatcagtttccgatctaaaaaactagattctagtcaggtaactgat
      S G I M Y I S F R S K K L D S S Q V T D
481  tacatcaatcgtgtagtcaaaccacagttttttaccattgaggggtgttgccgaagtacag
      Y I N R V V K P Q F F T I E G V A E V Q
541  gtatttgggtgcagctgaatatgcattacgtatttggctagatccacaaaaaatggcagct
      V F G A A E Y A L R I W L D P Q K M A A
601  caaaatctttctgtgccaacagtgatgtctgccctttctgcaataatgtacaaacggct
      Q N L S V P T V M S A L S A N N V Q T A
661  gcggggaacgataatggctattatgtgagttatcgtaataaagtagagactacaacgaaa
      A G N D N G Y Y V S Y R N K V E T T T K
721  tcagtggaacaactcagcaacttaattatttcatcaaatggcgatgatttagtgcggtttg
      S V E Q L S N L I I S S N G D D L V R L
781  cgtgatattgcaaccggtgaattaaataaagaaaatgataattcgcgtgctacggcaaat
      R D I A T V E L N K E N D N S R A T A N

```

841 ggtgcagagtcggttggttagccatcaatccaacctcgacagcaaaccctttgactgtc  
 G A E S V V L A I N P T S T A N P L T V  
 901 gcgaaaaaattcgccctttatatgaaagtataaaaacacaactgccagacagtatggaa  
 A E K I R P L Y E S I K T Q L P D S M E  
 961 agcgatattctttatgaccgcactattgccattaatagctctattcaggggtcataaaa  
 S D I L Y D R T I A I N S S I H E V I K  
 1021 actattggtgaagctactttgatcgtttttagtggttaattttaatgtttatcggttcgttc  
 T I G E A T L I V L V V I L M F I G S F  
 1081 cgtgctattttaattccaatattggctattccaatttctcttattggcgtattaatgctg  
 R A I L I P I L A I P I S L I G V L M L  
 1141 ctacaaagtttcaacttttctattaattttaatgactttgcttgctttaattcttgccata  
 L Q S F N F S I N L M T L L A L I L A I  
 1201 ggttttagttgtagatgatgctattgtggtgctggagaatattgatcgtcatattaagcg  
 G L V V D D A I V V L E N I D R H I K A  
 1261 ggagaaaacgccattccgagcagcaattattggtagcgtgaaattgcagtcctgttatt  
 G E T P F R A A I I G T R E I A V P V I  
 1321 tctatgactatcgattgatcgagtttactaccaatggctttaatggggggcattact  
 S M T I A L I A V Y S P M A L M G G I T  
 1381 ggcacattgtttaagagtttgctttaacccttgctggtgcagatatttatttctggtggt  
 G T L F K E F A L T L A G A V F I S G V  
 1441 gtggcattaacggttatcgccaatgatgagtagtaagttactcaaaccaatgctaaca  
 V A L T L S P M M S S K L L K S N A K P  
 1501 acatggatggaagaacgcgtagaacataccttaggtaaagtaaactcgtgtttacgaatac  
 T W M E E R V E H T L G K V N R V Y E Y  
 1561 atgcttgatctcgttatgctcaatcgtaaactcaatgctggcttttgcggtcgtgatttc  
 M L D L V M L N R K S M L A F A V V I F  
 1621 tcaacgctcccatttttgtttaattcactttctagtgaattaacgccaatgaagataaa  
 S T L P F L F N S L S S E L T P N E D K  
 1681 ggcgcatttattgcaattggaacgcgcatctagcgtaaatgtggattacattcaaat  
 G A F I A I G N A P S S V N V D Y I Q N  
 1741 gcaatgcaaccatataatgaaaaatgtaatggaaacacccgaagtttcttttggtatgagc  
 A M Q P Y M K N V M E T P E V S F G M S  
 1801 attgctggtgcgccaacttctaatactcgtaataatcatcacattgaaagattggaaa  
 I A G A P T S N S S L N I I T L K D W K  
 1861 gaacgttcacgtaacaatccgcaataatgaatgaaattaatgaaaaagcaaatcaatt  
 E R S R K Q S A I M N E I N E K A K S I  
 1921 ccagaagtgtcagtatcagcatttaacattcctgaaattgatacaggggaacaaggccct  
 P E V S V S A F N I P E I D T G E Q G P  
 1981 ccagtctctattgtattgaaaactgcacaagattataaatctttggcaaacaccgcagag  
 P V S I V L K T A Q D Y K S L A N T A E  
 2041 aaattcctcagtgcgatgaaagcctctggcaaatttatttatacaaatttagatttgacc  
 K F L S A M K A S G K F I Y T N L D L T  
 2101 tatgacactgcacaaatgactatttctgtggataaagaaaaagcgggaacttgcggtatt  
 Y D T A Q M T I S V D K E K A G T Y G I  
 2161 acaatgcaacaaatcagtaataactttaggagtttcttatctggtgacagttacgcgt  
 T M Q Q I S N T L G S F L S G A T V T R  
 2221 gtggatgtggatggacgcgcttataaagtcatcttcgaggtaaaacgagatgatcgctta  
 V D V D G R A Y K V I S Q V K R D D R L  
 2281 tcgccagaaaagtttccaaaattattatctaactgcatctaattggtcaatcagtgccatta  
 S P E S F Q N Y Y L T A S N G Q S V P L  
 2341 agtagtgattattagatgaaattagaaactcagccaacatcattaccgctttcagtcag  
 S S V I S M K L E T Q P T S L P R F S Q  
 2401 ttaaattcggctgaaatcagtgctgtaccaatgccgggtatatcaagtggatgaccatt  
 L N S A E I S A V P M P G I S S G D A I  
 2461 gcttggttcaacaacaggcaacagacaatttaccgcaaggctatacgtttgattttaaa  
 A W L Q Q Q A T D N L P Q G Y T F D F K  
 2521 tctgaagcacgtcaattagttccaagaaggcaacgcattagccgtcacttttgattggct  
 S E A R Q L V Q E G N A L A V T F A L A  
 2581 gttatcatcatattcttggtactttgccattcagtttgaatctatacgtgacccaatggta  
 V I I I F L V L A I Q F E S I R D P M V  
 2641 attatgatttctgtaccattagccgtaagtggatgcttggatgagcttaaatattttatcc

I M I S V P L A V S G A L V S L N I L S  
 2701 ttcttttagcatcgcaggaacaacattaaatctactctcaagttggggttgattactctc  
 F F S I A G T T L N I Y S Q V G L I T L  
 2761 gtgggattaatcaccaaacacggtatcttaatgtgccaagtggaagaagaacagctt  
 V G L I T K H G I L M C E V A K E E Q L  
 2821 aaccatggtaaaactcgaattgaggcaatcactcatgctgcaaaagtacgtttacgcca  
 N H G K T R I E A I T H A A K V R L R P  
 2881 atcctaatagacaacggcggcaatggtagctggcttaattccattactctatgcaacgggt  
 I L M T T A A M V A G L I P L L Y A T G  
 2941 gcaggagcggatatctcgcttttagtattgggatagtgattgtagcgggattatccattggt  
 A G A V S R F S I G I V I V A G L S I G  
 3001 actatthttcaccttggtcgtcttgctgtagtatatagctatgctgcaactgaacacaaa  
 T I F T L F V L P V V Y S Y V A T E H K  
 3061 ccattaccgggtttttgatgaaaataaaacaaccctaa  
 P L P V F D E N K T T H -

Figura 5.9.4.c. Secuencia completa de *acrB*



La existencia de los genes que codifican una bomba de reflujo como *acrAB* no es, en principio, señal de resistencia. Cuando las bombas de reflujo se expresan a niveles basales, normalmente su función no se manifiesta en forma de resistencia franca a los antibióticos. Sin embargo las bacterias que poseen el arsenal necesario para bombear con eficiencia, tienen muchas más posibilidades de evolucionar hacia resistencia múltiple a los antibióticos. Por una parte la función de la bomba de reflujo hace que las concentraciones de antibióticos en las dianas de acción sean considerablemente menores en aquellas bacterias que poseen un reflujo funcional. Es de sobras conocido que las concentraciones subletales de antibiótico son uno de los orígenes de la emergencia de resistencias. Por otra parte una bacteria que posee bombas de reflujo funcionales expresadas a bajo nivel (y que por tanto no inducen resistencia fenotípica) puede ver súbitamente alterada su susceptibilidad como consecuencia de alteraciones en la regulación génica que conduzcan a una sobreexpresión de las propias bombas. De hecho se haría necesario estudiar a nivel transcriptómico hasta que punto las situaciones de stress de la bacteria, como pueden ser las originadas por la presencia de un antibiótico o la acción de la inmunidad humoral o celular sobre la bacteria, afectan a la expresión de las bombas.

El empleo de antibióticos en la práctica de la odontología esta sujeta a discusión. Así Dirks y Terezhalmly en el año 2004 [202] escribían textualmente: *The routine use of antibacterial agents for the management of odontogenic infections has not been shown to be effective and is inappropriate*. El uso inadecuado de los antibióticos tiene consecuencias de tipo económico enormes, pero relativamente irrelevantes si se comparan con las consecuencias sobre la salud pública que esta práctica comporta. A la hora de analizar la situación hasta aquí descrita puede sorprender las dimensiones del desacuerdo, pero, en realidad sólo son consecuencia de la absoluta falta de información fiable. En realidad sólo se han publicado trabajos relativos a este cuestión en Noruega y Estados Unidos [203] [204]. De las más de 300 especies bacterianas presentes en la boca, y que en principio, pueden ser responsables de procesos infecciosos, se conocen solo algunas. No se han tratado de aislar e identificar propiamente en muchos casos. En la actualidad numerosas enfermedades sistémicas se han relacionado con la existencia de patología infecciosa buco dental. El ejemplo más clásico lo representa la endocarditis bacteriana, enfermedad que se produciría por la colonización metastásica de microorganismos procedentes de la cavidad bucal en el endocardio y en las válvulas

cardíacas; no obstante, la participación de estas bacterias de asiento bucal sigue siendo todavía un motivo de controversia a pesar de que nadie duda en recomendar y efectuar las pautas de profilaxis de la endocarditis bacteriana, práctica rutinaria que supone un gasto público importantísimo teniendo en cuenta que su eficacia, para muchos autores, resulta más que discutible.

No obstante, hoy día, se consideran también otros mecanismos etiopatogénicos distintos a la siembra bacteriana como es la producción, inducida por microorganismos patógenos, de mediadores de la inflamación que serían los responsables directos de otro tipo de patología sistémica, así como una alteración, cualitativa y cuantitativa, de la respuesta inmunitaria. De este modo, la enfermedad periodontal se ha relacionado con la génesis de la aterosclerosis [205] y a partir de ella, de enfermedades cardiovasculares como coronariopatías y trombosis cerebrales. Otro ejemplo clásico lo supone la agravación de la clínica y de los parámetros biológicos de los pacientes con diabetes insulino dependiente.

También se ha documentado la importancia del reservorio bucal en los tratamientos de erradicación gastroduodenal del *Helicobacter pylori*; de la participación de *Chlamydia pneumoniae* en neumonías que se presentan en colectivos de ancianos residentes en instituciones cerradas.

Finalmente también se ha relacionado la enfermedad periodontal de la mujer gestante con partos prematuros y recién nacidos de bajo peso, siendo considerada en la actualidad como un factor de riesgo para este tipo de complicaciones que implican una importante mortalidad perinatal.

El tratamiento de las periimplantitis (infecciones desarrolladas entre el titanio de los implantes y el hueso) se basan en la actualidad en la asunción de que los microorganismos implicados son los mismos que se encuentran normalmente en las periodontitis. El estudio de un número razonable de casos de periimplantitis con la consiguiente caracterización de las bacterias responsables y de su susceptibilidad antibiótica puede contribuir a optimizar los protocolos de tratamiento en esta afección de incidencia creciente como consecuencia del incremento de la práctica de la implantología [206] [207] [208]. En todas estas situaciones *A. actinomycetemcomitans* puede jugar un papel destacable. El empleo de antibióticos para el tratamiento de estas patologías es claramente distinto en España y en el resto de países adelantados. En parte ello es consecuencia de los diferentes criterios aducidos por los especialistas. En el año 2004 se publicó un autodenominado documento de consenso [209] en el que claramente

se recomienda el empleo de concentraciones enormes de amoxicilina con ácido clavulánico en odontología. Si el uso de la amoxicilina es discutible, la aplicación de clavulánico lo es mucho más, particularmente teniendo en cuenta la bajísima proporción de bacterias formadoras de  $\beta$ -lactamasa que se detectan en la cavidad oral.

## ***6. CONCLUSIONES***

---



## 6. CONCLUSIONES

1. La morfología colonial se relaciona directamente con la capacidad de aglutinación en medio líquido.
2. El modo de crecimiento (aglutinado o no) ejerce una influencia irrelevante sobre la susceptibilidad a los antibióticos en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tiene como mínimo una bomba de reflujo funcional que se inhibe por CCCP y que bombea efectivamente al exterior SDS, CV, EtBr y diversos antibióticos.
4. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tiene una única porina inespecífica funcional que forma canales de conductividad 700 pS en KCl 1 M.
5. El tamaño estimado del canal transmembrana formado por Omp39 es de un diámetro de 0.73 nm.
6. De los resultados obtenidos en este trabajo se podría obtener la conclusión de que a la luz de los conocimientos actuales la utilización de antibióticos en el tratamiento de la periodontitis juvenil localizada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no está plenamente justificada, así se desprende también de los datos de la bibliografía clínica sobre el particular. Además dado el arsenal genético susceptible de generar formas resistentes a los antibióticos de que dispone la bacteria, la presión selectiva por parte de los antibióticos sobre las poblaciones de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no está exenta de riesgos.



## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

---





---

**BIBLIOGRAFIA**

- <sup>1</sup> **Norskov-Lauritsen N, Kilian M.** Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56: 2135-2146.
- <sup>2</sup> **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 1994. Baltimore, Maryland, USA.
- <sup>3</sup> **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2005. Vol. II. Baltimore, Maryland, USA.
- <sup>4</sup> **Olsen I, Shah HN, Gharbia SE.** Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000. 1999; 20: 14-52.
- <sup>5</sup> **Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, Fraser GJ.** Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J Bacteriol.* 1992; 174: 2002-2013.
- <sup>6</sup> **Pulverer G, Schutt-Gerowitt H.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the human oral microflora. *Zentralbl Bakteriol.* 1998; 288: 87-92.
- <sup>7</sup> **Haffajee AD, Socransky SS.** Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 78-111.
- <sup>8</sup> **Brondz I, Olsen I.** Chemical differences in lipopolysaccharides from *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*: clues to differences in periodontopathogenic potential and taxonomic distinction. *Infect Immun.* 1989; 57: 3106-3109.
- <sup>9</sup> **Brondz I, Olsen I.** Differentiation between major species of the *Actinobacillus--Haemophilus--Pasteurella* group by gas chromatography of trifluoroacetic acid anhydride derivatives from whole-cell methanolysates. *J Chromatogr.* 1985; 342:13-23.

- 
- <sup>10</sup> **Brondz I, Olsen I.** Differentiation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* based on carbohydrates in lipopolysaccharide. *J Chromatogr.* 1984; 310: 261-272.
- <sup>11</sup> **Brondz I, Olsen I.** Multivariate analyses of carbohydrate data from lipopolysaccharides of *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, and *Haemophilus paraphrophilus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1990; 40: 405-408.
- <sup>12</sup> **Calhoon DA, Mayberry WR, Slots J.** Cellular fatty acid and soluble protein composition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and related organisms. *J Clin Microbiol.* 1981; 14: 376-382.
- <sup>13</sup> **Bolstad AI, Kristoffersen T, Olsen I, Preus HR, Jesen HB, Vasstrand EN, Bakken V.** Outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* studied by SDS-PAGE and immunoblotting. *Oral Microbiol Immunol.* 1990; 5: 155-161.
- <sup>14</sup> **Wilson ME.** The heat-modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: relationship to OmpA proteins. *Infect Immun.* 1991; 59: 2505-2507.
- <sup>15</sup> **Brondz I, Olsen I.** Multivariate chemosystematics demonstrate two groups of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8: 129-33.
- <sup>16</sup> **Valcarcel J, Allardet-Servent A, Bourg G, O'Callaghan D, Michalesco P, Ramuz M.** Investigation of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genome by pulsed field gel electrophoresis. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12: 33-39.
- <sup>17</sup> **Bercovier H, Escande F, Grimont PA.** Biological characterization of *Actinobacillus* species and *Pasteurella ureae*. *Ann Microbiol.* 1984; 135A.: 203-218.

- 
- <sup>18</sup> **Coykendall, A. L, Seterfield, J, Slots, J.** Deoxyribonucleic acid relatedness among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and other *Actinobacillus* species. *Int Sys Bacteriol.* 1983; 33: 422-424.
- <sup>19</sup> **Tonjum T, Bukholm G, Bovre K.** Identification of *Haemophilus aphrophilus* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by DNA-DNA hybridization and genetic transformation. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1994-1998.
- <sup>20</sup> **Tonjum T, Bukholm G, Bovre K.** Differentiation of some species of *Neisseriaceae* and other bacterial groups by DNA-DNA hybridization. *APMIS.* 1989; 97: 395-405.
- <sup>21</sup> **De Ley J, Mannheim W, Mutters R, Piechulla K, Tytgat R, Segers P, Bisgaard M, Frederiksen W, Hinz KH, Vanhoucke M.** Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Bacteriol.* 1990; 40: 126-137.
- <sup>22</sup> **Saarela M, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Asikainen T, von Troil-Linden B, Alaluusua S.** Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a-e detected with an rRNA gene probe. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8: 111-115.
- <sup>23</sup> **Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J.** Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6: 115-118.
- <sup>24</sup> **Han N, Hoover CI, Winkler JR, Ng CY, Armitage GC.** Identification of genomic clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1574-1578.
- <sup>25</sup> **Van Steenberg TJ, Colloms SD, Hermans PW, de Graaff J, Plasterk RH.** Genomic DNA fingerprinting by restriction fragment end labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 5572-5576.

- 
- <sup>26</sup> **DiRienzo JM, Slots J.** Genetic approach to the study of epidemiology and pathogenesis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol.* 1990; 35: 79-84.
- <sup>27</sup> **Van Steenberg TJ, Bosch-Tijhof CJ, van Winkelhoff AJ, Gmur R, de Graaff J.** Comparison of six typing methods for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2769-2774.
- <sup>28</sup> **Alaluusua S, Saarela M, Jousimies-Somer H, Asikainen S.** Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8: 225-229.
- <sup>29</sup> **Sedlacek I, Gerner-Smidt P, Schmidt J, Frederiksen W.** Genetic relationship of strains of *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* studied by ribotyping. *Zentralbl Bakteriol.* 1993; 279: 51-59.
- <sup>30</sup> **Riggio MP, Lennon A.** Rapid identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, and *Haemophilus paraphrophilus* by restriction enzyme analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1630-1632.
- <sup>31</sup> **Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T.** Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2002-2005.
- <sup>32</sup> **Asikainen S, Chen C, Slots J.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 65-68.
- <sup>33</sup> **Zambon JJ.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 1-20.
- <sup>34</sup> **Slots J.** Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 1982; 15: 606-609.

- 
- <sup>35</sup> **Pulverer G, Ko HL.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: fermentative capabilities of 140 strains. *Appl Microbiol.* 1970; 20: 693-695.
- <sup>36</sup> **Inouye T, Ohta H, Koikeguchi S, Fukui K, Kato K.** Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 57: 13-17.
- <sup>37</sup> **Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten MA, Nelson GM.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 3: 58-63.
- <sup>38</sup> **Slots J, Zambon JJ, Rosling BG, Reynolds HS, Christersson LA, Genco RJ.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. *J Periodontal Res.* 1982; 17: 447-448.
- <sup>39</sup> **Sakazaki R, Yoshizaki E, Tamura K, Kuramochi S.** Increased frequency of isolation of *Pasteurella* and *Actinobacillus* species and related organisms. *Eur J Clin Microbiol.* 1984; 3 : 244-248.
- <sup>40</sup> **Holt SC, Tanner AC, Socransky SS.** Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Infect Immun.* 1980; 30: 588-600.
- <sup>41</sup> **Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ.** Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun.* 1983; 40: 205-212.
- <sup>42</sup> **Lai CH, Listgarten MA, Hammond BF.** Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 1981; 16: 379-389.
- <sup>43</sup> **Hammond, B.F.** Isolation and characterization of membrane vesicles of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res.* 1981; 60: 333-340.

- 
- <sup>44</sup> **Nowotny A, Behling UH, Hammond B, Lai CH, Listgarten M, Pham PH, Sanavi F.** Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1982; 37: 151-154.
- <sup>45</sup> **Meyer DH, Fives-Taylor PM.** Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun.* 1993; 61: 4933-4936.
- <sup>46</sup> **Meyer DH, Fives-Taylor PM.** Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun.* 1994; 62: 928-935.
- <sup>47</sup> **Wilson ME, Zambon JJ, Suzuki JB, Genco RJ.** Generalized juvenile periodontitis, defective neutrophil chemotaxis and *Bacteroides gingivalis* in a 13-year-old female. A case report. *J Periodontol.* 1985; 56: 457-463.
- <sup>48</sup> **Killian, M.** Degradation of immunoglobulins A1, A2 and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect Immun.* 1981; 34: 757-765.
- <sup>49</sup> **Mannheim W, Pohl S, Hollander R.** On the taxonomy of *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*: DNA base composition, respiratory quinones, and biochemical reactions of representative collection cultures. *Zentralbl Bakteriol.* 1980; 246: 512-540.
- <sup>50</sup> **Slots J.** Salient Biochemical Characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch Microbiol.* 1982; 131: 60-67.
- <sup>51</sup> **Tanner AC, Visconti RA, Socransky SS, Holt SC.** Classification and identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* by cluster analysis and deoxyribonucleic acid hybridizations. *J Periodontal Res.* 1982; 17: 585-596.

- 
- <sup>52</sup> **Alcoforado GA, McKay TL, Slots J.** Rapid method for detection of lactose fermenting oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1987; 2: 35-38.
- <sup>53</sup> **King EO, Tatum HW.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *J Infect Dis.* 1962; 111: 85-94.
- <sup>54</sup> **Braunthal SD, Holt SC, Tanner AC, Socransky SS.** Cellular fatty acid composition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 625-630.
- <sup>55</sup> **Jantzen E, Berdal BP, Omland T.** Cellular fatty acid composition of *Haemophilus* species, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*). *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1980; 88: 89-93.
- <sup>56</sup> **Zambon JJ, Slots J, Genco RJ.** Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun.* 1983; 41: 19-27.
- <sup>57</sup> **Gmur R, McNabb H, van Steenberg T, Baehni P, Mombelli A, van Winkelhoff AJ, Guggenheim B.** Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8: 116-120.
- <sup>58</sup> **Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhala L, Lai CH, Jousimies-Somer H.** Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 277-279.
- <sup>59</sup> **Kaplan AH, Weber DJ, Oddone EZ, Perfect JR.** Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. *Rev Infect Dis.* 1989; 11: 46-63.



- 
- <sup>60</sup> **Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S.** Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 79-84.
- <sup>61</sup> **Gunsolley JC, Tew JG, Gooss CM, Burmeister JA, Schenkein HA.** Effects of race and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *J Periodontal Res.* 1988; 23: 303-307.
- <sup>62</sup> **Saxen L.** Juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1980; 7:1-19.
- <sup>63</sup> **Kronauer E, Borsa G, Lang NP.** Prevalence of incipient juvenile periodontitis at age 16 years in Switzerland. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 103-108.
- <sup>64</sup> **Saxby MS.** Juvenile periodontitis: an epidemiological study in the west Midlands of the United Kingdom. *J Clin Periodontol.* 1987; 14: 594-598.
- <sup>65</sup> **Bial JJ, Mellonig JT.** Radiographic evaluation of juvenile periodontitis (periodontosis). *J Periodontol.* 1987; 58: 321-326.
- <sup>66</sup> **Harley AF, Floyd PD.** Prevalence of juvenile periodontitis in schoolchildren in Lagos, Nigeria. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1988; 16: 299-301.
- <sup>67</sup> **Velazco CH, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Pacheco JJ.** Microbiological features of Papillon-Lefevre syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 622-627.
- <sup>68</sup> **Ebersole JL, Cappelli D.** Gingival crevicular fluid antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1994; 9: 335-344.

- 
- <sup>69</sup> **Gmur R, Hrodek K, Saxer UP, Guggenheim B.** Double-blind analysis of the relation between adult periodontitis and systemic host response to suspected periodontal pathogens. *Infect Immun.* 1986; 52: 768-776.
- <sup>70</sup> **Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K.** Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res.* 1995; 9: 55-62.
- <sup>71</sup> **Tsai CC, Shenker BJ, DiRienzo JM, Malamud D, Taichman NS.** Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. *Infect Immun.* 1984; 43: 700-705.
- <sup>72</sup> **Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS.** Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun.* 1979; 24: 233-243.
- <sup>73</sup> **Tsai CC, McArthur WP, Baehni PC, Hammond BF, Taichman NS.** Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun.* 1979; 25: 427-439.
- <sup>74</sup> **Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ.** Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1980; 28: 258-268.
- <sup>75</sup> **Robertson PB, Lantz M, Marucha PT, Kornman KS, Trummel CL, Holt SC.** Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 1982; 17: 275-283.
- <sup>76</sup> **Hammond BF, Lillard SE, Stevens RH.** A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1987; 55: 686-691.

- 
- <sup>77</sup> **Stevens RH, Lillard SE, Hammond BF.** Purification and biochemical properties of a bacteriocin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1987; 55: 692-697.
- <sup>78</sup> **Mintz KP, Fives-Taylor PM.** Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. *Infect Immun.* 1994; 62: 3672-3678.
- <sup>79</sup> **Ashkenazi M, White RR, Dennison DK.** Neutrophil modulation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Chemotaxis, surface receptor expression and F-actin polymerization. *J Periodontal Res.* 1992; 27: 264-273.
- <sup>80</sup> **Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ.** Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J Periodontol.* 1982; 53: 502-508.
- <sup>81</sup> **Helgeland K, Nordby O.** Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 1993; 28: 161-165.
- <sup>82</sup> **Shenker BJ, Kushner ME, Tsai CC.** Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1982; 38: 986-992.
- <sup>83</sup> **Chen PB, Davern LB, Neiders ME, Reynolds HS, Zambon JJ.** Analysis of in vitro lymphoproliferative responses and antibody formation following subcutaneous injection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Wolinella recta* in a murine model. *Oral Microbiol Immunol.* 1991; 6:12-16.
- <sup>84</sup> **Kinane DF, Mooney J, Ebersole JL.** Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1999; 20: 289-340.
- <sup>85</sup> **Kurita-Ochiai T, Ochiai K.** Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. *Infect Immun.* 1996; 64: 50-54.

- <sup>86</sup> **Kiley P, Holt SC.** Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect Immun.* 1980; 30: 862-873.
- <sup>87</sup> **Saglie R, Newman MG, Carranza FA Jr.** A scanning electron microscopic study of leukocytes and their interaction with bacteria in human periodontitis. *J Periodontol.* 1982; 53: 752-761.
- <sup>88</sup> **Mc Arthur, W.P.** Leucotoxic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Modulation by serum components. *J Periodont Res.* 1981; 16: 159-170.
- <sup>89</sup> **Tsai, C.C.** Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1981; 8: 338-348.
- <sup>90</sup> **Baehni PC, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Shenker BJ, Taichman NS.** Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral.* 1981; 26: 671-676.
- <sup>91</sup> **Mc Arthur, W.P.** Noncytolytic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on leukocyte functions. In: Host-parasite interactions in human periodontal diseases. *American Society for Microbiology.* Washington DC. 1982; 143: 158-167.
- <sup>92</sup> **Sela MN, Romano H.** Ultrastructural studies of the effect of human leukocyte extracts on periodontopathic bacteria. *Inflammation.* 1983; 7: 213-226.
- <sup>93</sup> **Hammond, B.F.** Isolation of plasmids of *Actinomyces viscosus*. *J Dent Res.* 1975; 54: abst. n° 217.
- <sup>94</sup> **Stevens, R.H.** Characterization of an inducible bacteriophage from a leukotoxic strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immunol.* 1982; 35: 343-349.
- <sup>95</sup> **Mc Connell, M.M.** Plasmids coding for heat enterotoxin production isolated from *Escherichia coli* 078: a comparison of their properties. *J Bacteriol.* 1980; 143: 158-167.

<sup>96</sup> **Houston, C. Koo, F.C.W., Peterson, J.W.** Characterization of *Salmonella* toxin released by mitomycin C-treated cells. *Infect Immun.* 1981; 32: 916-926.

<sup>97</sup> **Kugler KC, Biedenbach DJ, Jones RN.** Determination of the antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organisms. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 34: 73-76.

<sup>98</sup> **Madinier IM, Fosse TB, Hitzig C, Charbit Y, Hannoun LR.** Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J Periodontol.* 1999; 70: 888-892.

<sup>99</sup> **Yogev R, Shulman D, Shulman ST, Glogowski WG.** In vitro activity of antibiotics alone and in combination against *Actinobacillus actinomycescomitans* *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29: 179-181.

<sup>100</sup> **Carranza F.A.** Glickman's Clinical Periodontology. 7th ed. Philadelphia: W B Sanders 1990.

<sup>101</sup> **Todescane J.H.** Doença Periodontal. Conceitos e classificações. 2001. Edit. Santos. Sao Paulo.

<sup>102</sup> **Carranza F.A., Carranza F.A.** A suggested classification of common of periodontal disease. *J. Periodontol.* 1959; 30: 140-147.

<sup>103</sup> **Genco RJ, Loe H.** The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993; 2: 98-116.

<sup>104</sup> **Armitage GC.** Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.

<sup>105</sup> **Beck JD.** Risk revisited. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998; 26: 220-225.

<sup>106</sup> **Loe H.** Physiology of the gingival pocket. *Acad Rev Calif Acad Periodontol.* 1965; 13: 6-14.

<sup>107</sup> **Lindhe J, Hamp S, Loe H.** Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodontal Res.* 1973; 8: 1-10.

<sup>108</sup> **Baelum V, Fejerskov O, Manji F.** Periodontal diseases in adult Kenyans. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 445-452.

<sup>109</sup> **Dahlen G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H.** The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 802-809.

<sup>110</sup> **Offenbacher S.** Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 821-878.

<sup>111</sup> **Beck JD, Drake CW.** Do root lesions tend to develop in the same people who develop coronal lesions?. *J Public Health Dent.* 1997; 57: 82-88.

<sup>112</sup> **Shiloah J, Patters MR, Dean JW 3rd, Bland P, Toledo G.** The prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in humans 1 year after 4 randomized treatment modalities. *J Periodontol.* 1998; 69: 1364-1372.

<sup>113</sup> **Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J, Genco RJ.** Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 374-380.

<sup>114</sup> **Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, Arief EM, Armand S, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U.** Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 932-942.

<sup>115</sup> **Page RC.** The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 108-120.

<sup>116</sup> **Bergstrom J, Floderus-Myrhed B.** Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1983; 11: 113-116.

<sup>117</sup> **Bergstrom J, Persson L, Preber H.** Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. *Scand J Dent Res.* 1988; 96: 34-39.

<sup>118</sup> **Preber H, Bergstrom .** Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *J.Acta Odontol Scand.* 1985; 43: 315-320.

<sup>119</sup> **Preber H, Bergstrom J.** Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scand J Dent Res.* 1986; 94: 102-108.

<sup>120</sup> **Bergstrom J, Eliasson S.** Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res.* 1987; 22: 513-517.

<sup>121</sup> **Haffajee AD, Socransky SS.** Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 283-295.

<sup>122</sup> **Preber H, Bergstrom J, Linder LE.** Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 667-671.

<sup>123</sup> **Bostrom L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE.** Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 212-219.

<sup>124</sup> **Albandar JM, Rams TE.** Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000.* 2002; 29: 7-10.

<sup>125</sup> **Kinane DF, Chestnutt IG.** Relationship of diabetes to periodontitis. *Curr Opin Periodontol.* 1997; 4: 29-34.

<sup>126</sup> **Genco RJ.** Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996; 67: 1041-1049.

<sup>127</sup> **Kornman KS, Page RC, Tonetti MS.** The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 33-53.

<sup>128</sup> **Armitage GC.** Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1995; 7: 39-53.

<sup>129</sup> **Armitage GC.** Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 37-215.

<sup>130</sup> **Armitage GC, Grassi M.** Periodontal diseases in children and adolescents. *Phillip J Restaur Zahnmed.* 1987; 4: 193-198.

<sup>131</sup> **Lang NP, Tonetti MS.** Periodontal diagnosis in treated periodontitis. Why, when and how to use clinical parameters. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 240-250.

<sup>132</sup> **Greenstein G, Ciancio S.** Re: Non-surgical treatment of patients with periodontitis. *J Periodontol.* 1997; 68: 1023-1028.

<sup>133</sup> **Schroeder A.** Dental implantation. *Dtsch Med Wochenschr.* 1986; 111: 1427-1430.

<sup>134</sup> **Carranza F.A. Newman M.G.** Periodoncia clínica. 8ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1997.

<sup>135</sup> **Zambon JJ.** Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 879-925.

<sup>136</sup> **Slots, J.** The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1976; 84: 1-10.

<sup>137</sup> **Newman, M.G.** Predominant cultivable microbiota in periodontitis. *J Periodont Res.* 1977; 12: 120-128.



- 
- <sup>138</sup> **Asikainen, S., Alaluusua, S.** Bacteriology of dental infections. *Eur Heart J.* 1993; 14: 43-50.
- <sup>139</sup> **Moore, W.E.C.** Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 1985; 48: 507-519
- <sup>140</sup> **Genco, R.J., Christersson, L.A., Zambon, J.J.** Juvenil periodontitis. *Int Dent J.* 1986, 36: 168-176.
- <sup>141</sup> **Williams R.** Medical progress: Periodontal disease. *N Engl J Med.* 1990; 332: 373-382.
- <sup>142</sup> **Slots, J.** Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol.* 1986; 1: 48-55.
- <sup>143</sup> **Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS.** Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 648-659.
- <sup>144</sup> **Bodet C, Andrian E, Tanabe SI, Grenier D.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: A potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol.* 2007; 13; [Epub ahead of print].
- <sup>145</sup> **Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M.** Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 68-81.
- <sup>146</sup> **Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, Kjelleberg S.** Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* 2003; 185: 4585-4592.

- <sup>147</sup> **Webb JS, Lau M, Kjelleberg S.** Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* 2004; 186: 8066-8073.
- <sup>148</sup> **Boles BR, Thoendel M, Singh PK.** Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 16630-16635.
- <sup>149</sup> **Boles BR, Thoendel M, Singh PK.** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol.* 2005; 57: 1210-1223.
- <sup>150</sup> **Waite RD, Struthers JK, Dowson CG.** Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes high-frequency phase variation. *Mol Microbiol.* 2001; 42: 1223-1232.
- <sup>151</sup> **Cobb CM.** Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 443-490.
- <sup>152</sup> **Palcanis KG.** Surgical pocket therapy. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 589-617.
- <sup>153</sup> **Furuichi Y, Lindhe J, Ramberg P, Volpe AR.** Patterns of de novo plaque formation in the human dentition. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 423-433.
- <sup>154</sup> **Bergenholtz A, Brithon J.** Plaque removal by dental floss or toothpicks. An intra-individual comparative study. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 516-524.
- <sup>155</sup> **Mauriello SM, Bader JD, George MC, Klute PA.** Effectiveness of three interproximal cleaning devices. *Clin Prev Dent.* 1987; 9: 18-22.
- <sup>156</sup> **Graves RC, Disney JA, Stamm JW.** Comparative effectiveness of flossing and brushing in reducing interproximal bleeding. *J Periodontol.* 1989; 60: 243-247
- <sup>157</sup> **Caramia G.** Oral antibiotic therapy: problems and perspectives. *Pediatr Med Chir.* 2002; 24: 188-193.

- 
- <sup>158</sup> **Ashkenazi M, Ashkenazi S.** Judicious use of antibiotics in dental practice. *Refuat Hapeh Vehashinayim*. 2004; 21: 27-34, 94.
- <sup>159</sup> **Williams RC, Leone CW, Jeffcoat MK, Scott ER, Goldhaber P.** Tetracycline treatment of periodontal disease in the beagle dog. I. Clinical and radiographic course over 12 months-maximal effect on rate of alveolar bone loss. *J Periodontal Res*. 1981; 16: 659-665.
- <sup>160</sup> **Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR.** Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991; 2: 297-321.
- <sup>161</sup> **Tonetti MS, Cortellini P.** Case selection and treatment considerations of guided tissue regeneration in deep intrabony defects. *Curr Opin Periodontol*. 1997; 4: 82-88.
- <sup>162</sup> **Slots J, Evans RT, Lobbins PM, Genco RJ.** In vitro antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980; 18: 9-12.
- <sup>163</sup> **Akincibay H, Kocagoz T, Alacam R.** In vitro sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to various antibiotics. *Mikrobiyol Bul*. 1993; 27: 147-153.
- <sup>164</sup> **Pajukanta R, Asikainen S, Saarela M, Alaluusua S, Jousimies-Somer H.** In vitro antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Scand J Dent Res*. 1993; 101: 299-303.
- <sup>165</sup> **Avila-Campos MJ, Mol-Resende C, Carvalho MA, Damasceno CA, Cisalpino EO.** Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains to norfloxacin. *Braz Dent J*. 1995; 6: 29-32.
- <sup>166</sup> **Roe DE, Braham PH, Weinberg A, Roberts MC.** Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*. 1995; 10: 227-232.

- 
- <sup>167</sup> **Tinoco EM, Beldi MI, Campedelli F, Lana M, Loureiro CA, Bellini HT, Rams TE, Tinoco NM, Gjermo P, Preus HR.** Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J Periodontol.* 1998; 69: 1355-1363.
- <sup>168</sup> **Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE.** Bacterial susceptibility to amoxicillin and potassium clavulanate in advanced periodontitis patients not responding to mechanical therapy. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 846-853.
- <sup>169</sup> **Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA.** Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 296-305.
- <sup>170</sup> **Pavivic MJ, van Winkelhoff AJ, Douque NH, Steures RW, de Graaff J.** Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 107-112.
- <sup>171</sup> **Baquero F.** Antibiotic resistance in Spain: what can be done? Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health. *Clin Infect Dis.* 1996; 23: 819-823.
- <sup>172</sup> **Levy SB.** The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am.* 1998; 278: 46-53.
- <sup>173</sup> **Pallasch TJ.** Global antibiotic resistance and its impact on the dental community. *J N J Dent Assoc.* 2000; 71: 14-5, 18-9, 22-3 passim.
- <sup>174</sup> **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-1322.

- 
- <sup>175</sup> **Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH.** Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol.* 2003; 185: 4693-4698.
- <sup>176</sup> **Moller AJ.** Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontol Tidskr.* 1966; 74: Suppl: 1-380.
- <sup>177</sup> **Fine DH, Furgang D, Schreiner HC, Goncharoff P, Charlesworth J, Ghazwan G, Fitzgerald-Bocarsly P, Figurski DH.** Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. *Microbiology.* 1999; 145: 1335-1347.
- <sup>178</sup> **Wang ZL, Maeda N, Ohshima T, Takao A, Yang SH, Li JL. P.** Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2003; 38: 52-55.
- <sup>179</sup> **Slots J.** Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J Clin Microbiol.* 1981; 14: 288-294.
- <sup>180</sup> **Alcoforado G.** Organization of study and dentistry in Portugal. *Bull Acad Natl Chir Dent.* 1987; 33: 139-146.
- <sup>181</sup> **Sebald.M.** Genetic basis for antibiotic resistance in anaerobes. *Clin Infect Dis.* 1994; 4: S297-304.
- <sup>182</sup> **Baker PJ, Wilson ME.** Effect of clindamycin on neutrophil killing of gram-negative periodontal bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1521-1527.
- <sup>183</sup> **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Disk diffusion supplemental Tables. Document M100-S10. NCCLS, Wayne, P.A.
- <sup>184</sup> **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard. Sixth Edition M11-A6. NCCLS, Wayne, P. A.

- <sup>185</sup> **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. MIC Testing. Supplemental Tables Document M100-S10. NCCLS, Wayne, P.A.
- <sup>186</sup> **Beyer R., Pestova E, Millichap J.J, Stosor V, Noskin G.A, Peterson L.R.** A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2000; 44: 798-801.
- <sup>187</sup> **Puig M, Fuste C, Viñas M.** Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol.* 1993; 39: 108-111.
- <sup>188</sup> **American Society for Microbiology.** Manual of Methods for General Bacteriology. 1981. Washington, DC 20006.
- <sup>189</sup> **Benz R, Maier E, Chakraborty T.** Purification of OmpU from *Vibrio cholerae* classical strain 569B: evidence for the formation of large cation-selective ion-permeable channels by OmpU. *Microbiologia.* 1997; 13: 321-330.
- <sup>190</sup> **Benz R, Janko K, Boos W, Lauger P.** Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 511: 305-319.
- <sup>191</sup> **Benz R, Schmid A, Hancock RE.** Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J Bacteriol.* 1985; 162: 722-727.
- <sup>192</sup> **Leranoz AM, Fuste MC, Viñas M, Hull RA, Williams RP.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding proline oxidase of *Serratia marcescens*. *Microbios.* 1991; 67: 87-94.
- <sup>193</sup> **Sambrook J, Frisch E.F, Maniatis T.** Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring. 1989. Harbor Laboratory Press, New York,

- <sup>194</sup> **Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995; 226: 235-240.
- <sup>195</sup> **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230: 1350-1354.
- <sup>196</sup> **Sanchez L, Pan W, Viñas M, Nikaido H.** The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol.* 1997; 179: 6855-6857.
- <sup>197</sup> **Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 185-191.
- <sup>198</sup> **Fine DH, Furgang D, Barnett ML.** Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.* 2001 ; 28:697-700
- <sup>199</sup> **Muller D.** Characterization of outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog.* 1990; 9 : 227-233.
- <sup>200</sup> **Komatsuzawa, H.** Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene.* 2002; 288 : 3194-3203.
- <sup>201</sup> **Benz, R.** Uptake of solutes thorough bacterial outer membranes. A bacterial cell wall. *Elsevier Science B.V.* 1994. Amsterdam. 397-423.
- <sup>202</sup> **Dirks SJ, Terezhalmay GT.** The patient with an odontogenic infection. *Quintessence Int.* 2004; 35:482-502

- <sup>203</sup> **Handal T, Caugant D, Olsen I.** Antibiotic resistant bacteria isolated from subgingival plaque in a Norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 2003; 47: 1443-1446.
- <sup>204</sup> **Handal T, Olsen I Walker CB, Caugant DA.**  $\beta$ -lactase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology.* 2004; 10: 303-308.
- <sup>205</sup> **Gupta S.** Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis-focus on Chlamydia pneumoniae. *Atherosclerosis.* 1999; 143: 1-6.
- <sup>206</sup> **Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ.** Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 2000; 71: 1554-1560.
- <sup>207</sup> **Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA.** Pre-existing cardiovascular disease and periodontitis: a follow-up study. *J Dent Res.* 2002; 81: 186-191.
- <sup>208</sup> **Hull MW and Chow AW.** An approach to oral infections and their management. *Curr. Inf. Dis. Rep.* 2005; 7: 17-27.
- <sup>209</sup> **Bascones A, Aguirre JM, Bermejo A, Blanco A, Gay-Escoda C, Gonzlaez MA, Guitierrez JL, Jimenez Y/, Liebana J, Lopez Marcos JF, Maestre JR, Perea E, Prieto J, de Vicente JC.** Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Medicina Oral Patologia Oral Cirugia bucal* 2004; 9: 363-376.