



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL.  
ÁREA DE PATOLOGÍA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**“Papel del antígeno O del lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* en el perfil de diferenciación de macrófagos”**

**Alfredo Ignacio Castro Martínez**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Marcela Hernández Ríos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asist. Anilei Hoare Teuche**

**Prof. Asist. Alejandro Escobar Alvarez**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1160741**

**Santiago - Chile**

**2019.**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL.  
ÁREA DE PATOLOGÍA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**“Papel del antígeno O del lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* en el perfil de diferenciación de macrófagos”**

**Alfredo Ignacio Castro Martínez**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Marcela Hernández Ríos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Asist. Anilei Hoare Teuche**

**Prof. Asist. Alejandro Escobar Alvarez**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1160741**

**Santiago - Chile**

**2019.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo, y no podría ser de una forma distinta, quiero agradecer a mi familia, por el apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de mi vida, y en cada proyecto y/o meta que me he propuesto. Gracias mamá, papá, Martín, Francisca, Bolti y Yoru.

Un especial agradecimiento a Deisy, mi mamá, porque gran parte de este logro es de ella, voy a estar agradecido eternamente por todo el esfuerzo que ha puesto a lo largo de su vida por hacer la mía un poquito más fácil. Te amo Deisy.

Otra persona extremadamente importante para mí, y sé la importancia que tiene este acontecimiento para ella es mi mamá, sé que en el momento en que pueda leer este pequeño agradecimiento su felicidad será infinita, porque este logro es suyo, lo ha forjado durante muchos años a punta de esfuerzo y trabajo, siempre siendo su prioridad la familia. Muchas gracias por todo, eres la mejor abuela que alguien podría tener.

Agradecer también al laboratorio de biología periodontal, en especial a la profesora Marcela Hernández, son 6 años trabajando con ella, sin dudas, han sido años de mucho aprendizaje en un área totalmente desconocida para mí como era la investigación en odontología, muchas gracias por la oportunidad de pertenecer al laboratorio, y por guiarme como tutora en este trabajo. Mención honrosa a Jessica y Berni, quiero destacar su labor del día a día en el laboratorio, su ayuda es fundamental en este trabajo, y para todos los que trabajamos en el laboratorio, muchas gracias.

Igualmente agradecer al laboratorio de microbiología, especialmente a Darna, Dani y Carla por siempre tener una disposición de oro, por ayudarme siempre que lo necesité, y por la buena onda que logran generar en el ambiente laboral.

Durante estos 7 años de universidad, el aprendizaje y el crecimiento personal han sido enormes, fue una etapa muy rica en muchos ámbitos. Si bien recibí una buena formación para ser odontólogo, lo que más alegría me da haber recibido a lo largo de estos años son los amigos y experiencias vividas, es por eso que quiero agradecer a cada una de las personas con las que compartí, aunque fuera un minuto

en la facultad, porque cada persona deja una enseñanza y un aprendizaje especial. Gracias amigos, compañeros, profesores, pacientes, voluntarios y auxiliares.

Quiero hacer un énfasis en tres personas muy especiales para mí, y que sin duda me brindaron una amistad que va a perdurar en el tiempo. Braulio muchísimas gracias por estar siempre, en las buenas y más aún en las malas, eres un gran amigo y has sido un pilar en todo este proceso. Panchi, amiga ameba, muchas gracias por tu amistad incondicional, eres una gran mujer, aunque muchas veces me llevaste por el mal camino de las fiestas jajaja voy a estar siempre agradecido por todo. Karin Linker, otra gran mujer que tengo la fortuna de tener como amiga, muchísimas gracias por tu amistad, por siempre apoyarme y ayudarme, y aunque sé que no te gustan los agradecimientos estarás obligada a leerlos jajaja.

Gracias al equipo de basket de la facultad, son 7 años jugando con ellos, el recambio de jugadores ha sido bastante, por lo que he podido conocer a grandes personas y entrenadores, un abrazo especial a Nano y Álvaro.

Gracias Profe Marta Gajardo por darme la oportunidad de formar parte del equipo, y por darme la oportunidad de conocer, compartir y trabajar junto a grandes personas con los mismos intereses y convicciones, gracias Andrés, Nacho, Cristián, Rommel, Gonzalo, Gabriel, Paulo, Braulio, Marce, Frank, Paty, Ceci, Cristián, Cota. Podría escribir muchas páginas de agradecimientos y experiencias vividas, pero creo que lo importante es lo que viene más adelante del documento jajaja. Nuevamente muchas gracias por todo.

## INDICE

GLOSARIO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS .....	10
3. OBJETIVO GENERAL .....	10
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
5. METODOLOGÍA.....	11
6. RESULTADOS.....	17
7. DISCUSIÓN .....	34
8. CONCLUSIONES .....	40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
10. ANEXOS .....	49

## GLOSARIO

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGO	Antígeno O
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
CD14	Cluster de Diferenciación 14
CD163	Cluster de Diferenciación 163
CD206	Cluster de Diferenciación 206
CD64	Cluster de Diferenciación 64
CD80	Cluster de Diferenciación 80
CEGS	Células epiteliales gingivales
FVD	Sonda de viabilidad celular
GAL	Galactosa
GALNAC	N-Acetilgalactosamina
GLC	Glucosa
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-1B	Interleuquina 1 beta
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
LPS	Lipopolisacárido
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón Fosfato Salinos
RHA	Ramnosa
SFB	Suero Fetal Bovino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TH1	Linfocito T helper 1
TH17	Linfocito T helper 17
THP-1	Línea celular de monocitos humanos derivados de leucemia
TLR-2	Receptor tipo <i>Toll</i> 2
TLR-4	Receptor tipo <i>Toll</i> 4
TNFA	Factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

**Introducción:** *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es considerado patobionte “clave” en el inicio y progresión de enfermedades periodontales, uno de sus factores de virulencia e inmunógeno es el lipopolisacárido (LPS); mientras que en nuestros aislados clínicos de pacientes con periodontitis se observa que el LPS presenta su estructura completa, en aislados clínicos de pacientes sanos no presenta Antígeno O (AgO).

**Objetivo:** Caracterizar el perfil de polarización de macrófagos THP-1, y determinar niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias inducidas por el LPS de las cepas de *P. gingivalis* silvestre (W50) y un mutante carente de AgO ( $\Delta$ PG1051).

**Métodos:** Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos con PMA y estimuladas por 24 horas con LPS de las cepas W50 (ATCC 53978),  $\Delta$ PG1051 mutante nulo para gen de la ligasa del AgO (WaaL) y  $\Delta$ PG1051 cepa complementada para WaaL. Se utilizaron como controles positivos LPS comercial de *Escherichia coli* y de *P. gingivalis* 33277, y como control negativo, medio de cultivo. El perfil de polarización se evaluó mediante citometría de flujo con marcadores M1 (CD64 y CD80) y M2 (CD163 y CD206). El nivel de citoquinas secretadas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-12) se determinó mediante Multiplex en plataforma Luminex. El análisis estadístico se realizó con STATA 12®.

**Resultados:** Se identificó una tendencia hacia una mayor polarización M1 al estimular con *P. gingivalis* en comparación con el control sin estímulo, particularmente para porcentaje de macrófagos CD64+, que fue mayor en las cepas W50 y  $\Delta$ PG1051 versus *E. coli*, mientras que el porcentaje CD80+ y CD206+ fue significativamente mayor en *E. coli*, respecto cepas W50,  $\Delta$ PG1051 y controles ( $p < 0,05$ ). En los niveles de citoquinas, se encontraron aumentos de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-10 al estimular con *P. gingivalis* versus el control sin estímulo. No se observaron diferencias significativas respecto de la presencia o ausencia del OAg.

**Conclusiones:** *P. gingivalis* presenta un potencial inmunogénico bajo, comparado con *E. coli*. La diferenciación M1, sobre la base de marcadores de superficie y secreción de citoquinas dependería de otros factores de virulencia de *P. gingivalis*, diferentes del AgO.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Patologías infecciosas de la cavidad oral.

La cavidad oral es una de las zonas anatómicas de nuestro organismo con mayor número y variedad de bacterias aerobias y anaerobias. Estos microorganismos interactúan tanto entre sí como con el medio oral, estableciendo un complejo ecosistema dinámico siendo compatibles con la salud del hospedero (Valle et al., 1995). En determinadas circunstancias, bacterias de la microbiota normal oral pueden comportarse de manera oportunista, dando lugar a infecciones endógenas caracterizadas por ser polimicrobianas y mixtas (microbiota aerobia y anaerobia) (Rodríguez et al., 2009) .

Las infecciones mixtas de la cavidad oral, según la zona anatómica en la que se desarrollen, se pueden clasificar en:

- Odontogénicas: Son las más frecuentes, y afectan tanto al diente como al periodonto; dentro de esta clasificación se incluye la caries dental y las enfermedades periodontales.
- No odontogénicas: Afectan a mucosas y/o estructuras extra dentales (glándulas salivares, lengua, etc) (Matesanz et al., 2005).

Las enfermedades periodontales son condiciones inflamatorias crónicas asociadas a la formación y persistencia de una biopelícula bacteriana subgingival altamente patógena que desencadena la respuesta inmune/inflamatoria del hospedero, llevando a la destrucción de los tejidos periodontales de soporte y la eventual pérdida dentaria (Eke et al., 2012; Meyle & Chapple, 2015).

Entre las enfermedades periodontales, se encuentran la periodontitis marginal (PM) que se define como la presencia de inflamación gingival en los sitios en los que se ha producido migración de la inserción epitelial a las superficies radiculares, acompañada de una pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar (Armitage, 1995). Actualmente y según la nueva clasificación de las enfermedades periodontales del año 2018 la antigua PM se denomina “periodontitis” y se define como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a biopelículas disbióticas, y que se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dentario

(Papapanou et al., 2018). La periodontitis constituye un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia, así como también porque provoca pérdida dentaria y discapacidad, afecta negativamente la función masticatoria y estética, constituye un factor de desigualdad social y perjudica la calidad de vida de los individuos que la padecen (Papapanou et al., 2018). Además, dentro del grupo de las enfermedades periodontales, se encuentra la periodontitis apical (PA) definida como una enfermedad infecciosa causada por bacterias que colonizan el sistema de canales radiculares, que dada la incapacidad de eliminar las bacterias, el hospedero intenta localizar la infección, y así evitar la diseminación a expensas de la degradación del tejido periodontal apical, con la formación de una lesión osteolítica en la región apical, un signo distintivo de las formas crónicas de la enfermedad, la PA representa una de las causas principales de pérdida dentaria en adultos (Hargreaves et al., 2012; Martinho et al., 2016)

La periodontitis (anteriormente denominada PM) fue la sexta condición más prevalente en el año 2010, afectando al 10,8% o 743 millones de personas en el mundo. La prevalencia varía según el país, siendo desde un 3,6% en Fiji a un 18,7% en Chile. Algunos países como Chile, Brasil, Kenia, Indonesia, Australia y Grecia fueron aquellos donde la prevalencia de periodontitis fue significativamente más alta que la media global (Kassebaum et al., 2014). La prevalencia de PA varía desde un 34% en España -estimada mediante uso de radiografía panorámica- (López-López et al., 2012), hasta un 51,4% en Brasil mediante “cone beam”, el cual presenta una mayor sensibilidad (Paes da Silva et al., 2013).

Entre los patobiontes orales causantes de la periodontitis y PA encontramos especies pertenecientes al denominado “complejo rojo” como *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *P. gingivalis* (Buonavoglia et al., 2013; Socransky & Haffajee, 2005). Estas especies han sido asociadas principalmente a periodontitis severa, periimplantitis e infección del canal radicular, además de asociarse a formas agudas y sintomáticas de PA (Wang et al., 2010).

La creciente evidencia epidemiológica ha asociado las enfermedades periodontales con varias condiciones y enfermedades sistémicas, tales como diabetes, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide, efectos adversos

en el embarazo, obesidad y síndrome metabólico (Chapple, 2014). Se ha demostrado que existe un aumento significativo en la proteína C reactiva en pacientes con periodontitis (anteriormente denominada PM) y presencia de *P. gingivalis* en comparación con pacientes con periodontitis y en ausencia de la bacteria (Winning et al., 2015). También se sostiene la existencia de una relación entre la presencia de PA y un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV), especialmente aterogénesis en adultos jóvenes; sin embargo, aunque la evidencia epidemiológica sustenta esta asociación, se requieren estudios mecanísticos que sostengan su plausibilidad biológica (Costa et al., 2014; Cotti et al., 2011; Cotti & Mercurio, 2015).

## **1.2 Factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis* y su implicancia en las periodontitis.**

*P. gingivalis* corresponde a un cocobacilo Gram negativo, no móvil, que tiene un requerimiento de crecimiento absoluto por el grupo hemo o el producto de oxidación de  $Fe^{2+}$  (hemina), cuyo metabolismo genera que su colonia se pigmente de negro en agar sangre suplementado con hemina y menadiona (Pathirana et al., 2010). Se ha reconocido como un patobionte “clave” en el inicio y progresión de la periodontitis (anteriormente denominada PM), debido a su capacidad de inducir disbiosis entre el hospedero y la biopelícula microbiana subgingival, y corresponde a la especie bacteriana más frecuentemente aislada en pacientes con periodontitis (Lam et al., 2014).

La detección de *P. gingivalis* en la biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis (anteriormente denominada PM) es significativamente mayor (80%) en comparación con individuos sanos (15%) (Oliveira et al., 2016), en cuanto a la población chilena la frecuencia de detección de *P. gingivalis* corresponde a un 83,3% en pacientes con periodontitis (anteriormente denominada PM) (Herrera et al., 2008). Por otro lado, la prevalencia de *P. gingivalis* en canales radiculares con PA aguda corresponde a un 17,8%, mientras que en la forma crónica la prevalencia de *P. gingivalis* es un 11,7% (Wang et al., 2010). En otro estudio desarrollado en Corea mediante detección por PCR, la prevalencia de *P. gingivalis* en canales radiculares con patología periapical fue de 22,5% (Seol, Cho, Chung, & Bae, 2006).

La patogenicidad de *P. gingivalis* depende de sus antígenos de superficie y la subsiguiente respuesta inmune producida contra ellos (Díaz et al., 2015). *P. gingivalis* posee un número de factores de virulencia que son esenciales para obtener los nutrientes necesarios del hospedero, evadir al sistema inmune, y en ocasiones facilitar la colonización de la bacteria en la cavidad oral (Pathirana et al., 2010). Los factores de virulencia de *P. gingivalis* incluyen al lipopolisacárido (LPS), cápsula de polisacáridos, fimbrias, hemoaglutininas y enzimas proteolíticas extracelulares asociadas a adhesinas (Pathirana et al., 2010). Entre los componentes de la superficie de la envoltura bacteriana, los polisacáridos como el antígeno K (cápsula) y el LPS son esenciales para la virulencia de *P. gingivalis* (Jain & Darveau, 2010; Laine & Winkelhoff, 1998).

### **1.3 Estructura del lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* y la importancia del antígeno O.**

El LPS es el principal constituyente de la membrana externa de bacterias Gram negativo, y contiene la endotoxina (lípid A) responsable de las manifestaciones tóxicas e inducción de potentes efectos patológicos de la infección por *P. gingivalis*. Este glucolípid complejo está compuesto por tres dominios covalentemente vinculados: el lípid A que está inserto en la membrana externa, el oligosacárido central (core) y el antígeno O (AgO) que es el segmento más externo y variable del LPS (Raetz & Whitfield, 2002). En el proceso de biosíntesis del LPS, la enzima AgO ligasa (WaaL) codificada por el gen *PG1051* tiene un rol fundamental, dado que tiene como función catalizar la etapa final en el ensamblaje del LPS, ligando la molécula de AgO preformado al core-lípid A en la cara periplásmica de la membrana citoplásmica de *P. gingivalis* (Rangarajan et al., 2008).

El LPS de *P. gingivalis* es un potente agente estimulador de citoquinas proinflamatorias, y se ha reportado que induce la reabsorción ósea tanto en modelo experimental de ratas como en líneas celulares *in vitro* (Jotwani & Cutler, 2004; Nishida et al., 2001). También se ha demostrado que el LPS de *P. gingivalis* puede inducir una respuesta inflamatoria en varios tipos celulares, tales como macrófagos,

fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales, a través de la activación de los receptores tipo Toll (TLR)-2 y TLR-4 (Soto et al., 2015).

Existen modificaciones inusuales en el LPS de *P. gingivalis* en comparación con el LPS de otras bacterias Gram negativo, que afectan su actividad endotóxica, lo que tiene implicancias en las propiedades inmunogénicas de *P. gingivalis* y en la patogénesis de esta. Por ejemplo, el lípido A de *P. gingivalis* presenta patrones de fosforilación y acilación diferente en comparación con el lípido A de enterobacterias (Pathirana et al., 2010). Otra característica particular del LPS de *P. gingivalis* es que está compuesto por dos macromoléculas de LPS distintas sintetizados dentro de la misma bacteria, lo cual fue inicialmente descubierto en la cepa *P. gingivalis* W50 (ATCC 53978) (Rangarajan et al., 2008). Una de esas macromoléculas de LPS se conoce como O-LPS, y se constituye de una unidad repetitiva de AgO compuesto por un esqueleto de [Glc-Rha-GalNAc-Gal] modificado por fosfoetanolamina y unido al lípido A. La otra molécula de LPS de *P. gingivalis* W50 se denomina A-LPS y está formada por unidades repetitivas de un polisacárido aniónico que contiene mananos fosforilados (APS) y que también se unen al lípido A (Díaz et al., 2015; Rangarajan et al., 2008).

La inactivación de WaaL tiene como consecuencia la supresión de la síntesis de ambos LPS en *P. gingivalis* W50, tanto O-LPS como A-LPS. Por lo tanto, la ligasa WaaL parece tener doble especificidad, y es capaz de ligar las moléculas de O-LPS y de A-LPS a la región core-lípido A (Paramonov et al., 2009). Esta doble especificidad de WaaL en la etapa final de la síntesis del LPS, también ha sido demostrada en la síntesis de O-LPS y M-LPS en *Escherichia coli* (Meredith et al., 2007).

En *P. gingivalis* aisladas a partir de sujetos que sufren de periodontitis (anteriormente denominada PM), se ha demostrado que su LPS tiene su estructura completa con moléculas de AgO de alta masa molecular (fenotipo liso), y no así en aislados obtenidos de sujetos sanos que poseen un LPS trunco carente de AgO de alta masa molecular (fenotipo rugoso) (Díaz et al., 2015). Este hallazgo indicaría que el AgO contribuiría significativamente a la virulencia de *P. gingivalis*. En relación

a esto, se ha demostrado que la presencia de la molécula de AgO completa se asocia con una mayor resistencia a polimixina B (Díaz et al., 2015).

Adicionalmente, un estudio realizado en células epiteliales gingivales (CEG) demostró que la presencia de la región de AgO en el LPS de *P. gingivalis* es esencial para aumentar la viabilidad y proliferación celular, así como para inhibir la apoptosis en CEGs infectadas (Soto et al., 2016).

Actualmente, no existe evidencia sobre la relevancia de la región AgO del LPS de *P. gingivalis* en la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos, que es central para inducción de la respuesta del hospedero en enfermedades periodontales.

#### **1.4 Perfiles de diferenciación de macrófagos y su asociación con periodontitis.**

Los macrófagos corresponden a una subpoblación celular muy importante en la respuesta inmune innata. Éstos se encuentran entre los primeros tipos celulares que reconocen compuestos derivados de microorganismos invasores. Por otra parte, también son esenciales para iniciar y sostener la respuesta inmune adaptativa (Holden et al., 2014). Por lo anterior, son células centrales en la patofisiología de diferentes condiciones clínicas, incluyendo aquellas de naturaleza microbiana e inflamatoria, tales como las enfermedades periodontales (Derlindati et al., 2015). La activación de los macrófagos se lleva a cabo mediante la unión de los receptores TLR, presentes en la superficie celular de los macrófagos, a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), tales como el LPS, desencadenando de este modo los procesos de fagocitosis, activación de respuestas humorales y celulares, y la producción de mediadores inflamatorios (citoquinas, especies reactivas de oxígeno -ROS-, y metaloproteinasas de matriz -MMPs-).

Los macrófagos son células esenciales en la regulación de la inflamación, la respuesta inmune, la homeostasis ósea y la remodelación tisular (Dezerega et al., 2012; Holden et al., 2014; Sima & Glogauer, 2013). Éstos pueden diferenciarse en respuesta a las citoquinas liberadas por los linfocitos activados o los tejidos dañados en macrófagos M1 (activación clásica) o M2 (activación alternativa) (Derlindati et al., 2015). La diferenciación de M1 ocurre en presencia de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ),

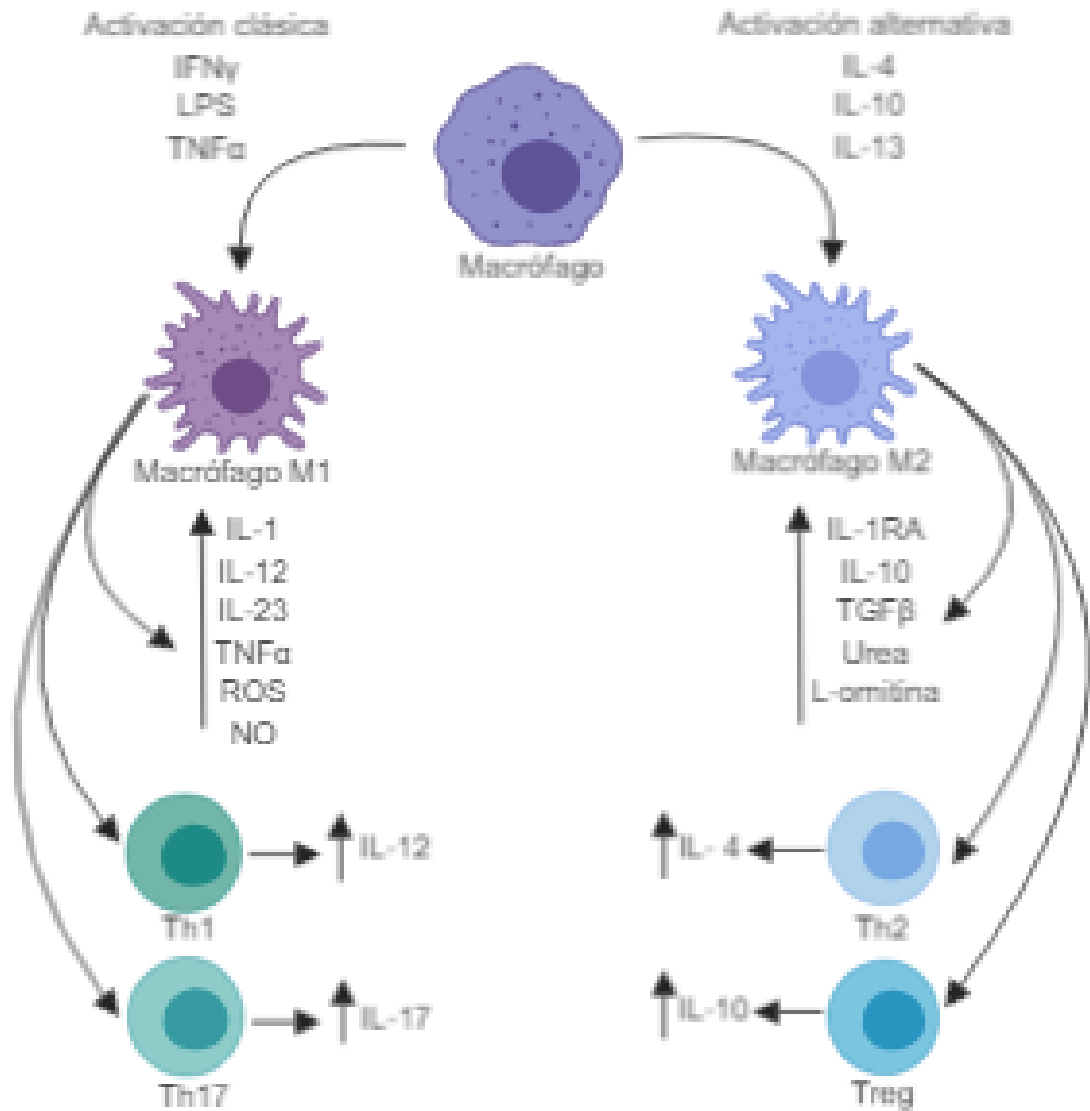
LPS o Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), los cuales están relacionados con la inflamación y defensa del hospedero (Lam et al., 2014). M1 aumenta la expresión de CD86 y la disminución en la expresión de CD206 en la superficie, así como aumenta la producción de IL-1, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (NO). La diferenciación de macrófagos a M2 ocurre en presencia de IL-4, IL-10 o IL-13. Éstos tienen un rol inmunorregulador y reparador de tejidos secretando las citoquinas antiinflamatorias IL-10, IL-1RA y factor de crecimiento transformante (TGF) - $\beta$ ; pero no son eficientes en la presentación del antígeno y la destrucción microbiana (Stout et al., 2005). El fenotipo M2 se caracteriza por una baja producción de NO, un aumento de CD206 y una disminución de CD86 en la expresión de superficie, y un incremento en la secreción de urea y L-ornitina (precursor en la síntesis de colágeno) (Lam et al., 2014) (Figura 1).

Estudios recientes validaron los marcadores de superficie CD80 y CD64 para M1; así como CD163 (inducido por IL-10), y CD206 (inducido por IL-4) para perfiles M2, en tejidos humanos, sugiriendo su uso combinado con un marcador de macrófagos (Ambarus et al., 2012; Barros, Hauck, Dreyer, Kempkes, & Niedobitek, 2013; Ortiz et al., 2015).

En relación con las enfermedades periodontales, los macrófagos se encuentran entre las poblaciones de células inflamatorias predominantes en las lesiones (Cavalla et al., 2013; Holden et al., 2014). Los macrófagos M1 promueven respuestas de linfocitos T helper (Th)1 y (Th)17, las cuales están estrechamente asociadas con la destrucción del tejido periodontal y apical, a través de la secreción de IL-12 e IL-17, respectivamente. Los macrófagos M2, por otro lado, interactúan con las células Th2 y células T reguladoras (Treg), que se consideran protectoras periodontales a través de la secreción de IL-4 e IL-10, respectivamente (Hernandez et al., 2011) (Figura 1).

La infiltración de macrófagos M1 inducido por LPS de *P. gingivalis* ha demostrado causar la destrucción del tejido periodontal en un modelo murino de periodontitis (Lam et al., 2014). IL-1 $\beta$ , citoquina estrechamente asociada al fenotipo M1, tendría un importante rol en la expresión de TNF- $\alpha$ , que a su vez modula la producción de RANK-L, llevando a la reabsorción ósea (Gazivoda et al., 2009; Ogawa & Uchida,

1996). Por otro lado, la importancia de IL-10, citoquina relacionada al fenotipo M2, como factor supresor de la respuesta inmune en lesiones periapicales fue descrita en ratas en un modelo nulo para IL-10 (Gazivoda et al., 2009).



**Figura 1:** Perfiles de diferenciación de macrófagos.



En la actualidad se desconoce el papel específico de cada uno de los constituyentes estructurales del LPS (lípidos A, core y AgO) en la respuesta inflamatoria inducida por *P. gingivalis* en periodontitis (anteriormente denominada PM) y PA. Particularmente, el AgO resulta de especial interés debido a que es el segmento más externo y variable del LPS, y por lo tanto está en la primera línea de contacto de la bacteria con componentes del sistema inmune del hospedero. Interesantemente, actualmente no existen estudios que evalúen su efecto en la respuesta inflamatoria, específicamente en los perfiles de diferenciación de macrófagos.

## **2. HIPÓTESIS.**

La presencia del antígeno O en la estructura del lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* estimula un perfil predominantemente M1 en macrófagos THP-1.

## **3. OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar el perfil de polarización de macrófagos THP-1, y determinar los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias inducidas por la estimulación con lipopolisacárido obtenido desde *Porphyromonas gingivalis* W50 y la mutante nula para el gen de la ligasa del antígeno O *Porphyromonas gingivalis*  $\Delta$ PG1051.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar el perfil de polarización de macrófagos THP-1 estimulados con lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* cepas W50 y  $\Delta$ Pg1051 mutante para el gen de la ligasa del antígeno O mediante los marcadores de superficie específicos para M1 y M2.
2. Determinar los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-12 secretados por macrófagos THP-1 estimulados con lipopolisacárido de cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50 y la mutante para el gen de la ligasa del antígeno O  $\Delta$ PG1051.

## 5. METODOLOGÍA.

Tipo de estudio experimental *in vitro*, aprobado por el comité de ética científico de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (#2016/08) (Anexo 1).

### 5.1 Cultivo para extracción y purificación de lipopolisacárido de cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051.

*P. gingivalis* fue crecida rutinariamente en el laboratorio en medio cerebro-corazón (BHI) suplementado con hemina y menadiona (5% sangre defibrinada de caballo, 0,5mg/l de hemina, y 0,5 mg/l de menadiona). Ya sea en medio líquido o sólido (suplementado con 5% sangre de caballo defibrinada y 1,5% agar agar). En todos los casos, los cultivos fueron incubadas en cámara de anaerobiosis (5% CO<sub>2</sub>, 5%H<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) (BACTRONEZ Anaerobic Workstation) a 37°C.

Para obtener los cultivos para la extracción de LPS, se generó un preinóculo de 10 ml a partir de un cultivo sólido de la cepa de referencia de *P. gingivalis* W50 (ATCC 53978), la cepa  $\Delta$ PG1051 que corresponde a un mutante de *P. gingivalis* cepa W50 en el gen *PG1051* que codifica para la enzima AgO ligasa (WaaL), y C $\Delta$ PG1051 que corresponde a una cepa de *P. gingivalis* W50 mutante en WaaL complementada para el gen *PG1051*, dicho gen es reincorporado en *cis* para permitir que *P. gingivalis* produzca una molécula de LPS completa (Rangarajan et al., 2008).

Se monitoreó el crecimiento bacteriano hasta alcanzar una turbidez cercana a Densidad Óptica (DO)<sub>600</sub> = 0,6-1,0, posteriormente se inocularon para iniciar los cultivos en 50 ml de BHI como se indicó), ajustado a una DO<sub>600</sub> inicial de 0,2 y se monitoreó su crecimiento hasta alcanzar una (DO)<sub>600</sub> = 0,6-1,3 correspondiente a la fase exponencial tardía del crecimiento bacteriano. Posteriormente, se centrifugó a 3900 x g por 20 min, se descartó el sobrenadante y se obtuvo el pellet bacteriano que fue conservado a -80°C.

Cada cultivo de la cepa de *P. gingivalis* W50,  $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051 de los cuales se extrajo y purificó el LPS, fueron realizados en tres cultivos independientes para

cada una de las cepas, es decir, se obtuvieron tres pellets bacterianos para cada cepa.

## **5.2 Extracción y purificación de LPS de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, ΔPG1051 y CΔPG1051.**

El LPS fue purificado en base a una modificación del protocolo de extracción con TRIzol (Eugene & Hackett, 2000). Brevemente, el pellet obtenido desde 50 ml de cultivo bacteriano se resuspendió en 1 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q libre de pirógeno, el pellet fue sonificado (QSonica, Arquimed) durante 12 ciclos de 30 segundos en hielo con 30 segundos de descanso entre ciclos, posteriormente se centrifugó a 10.900 x g por 15 min. Se conservó el sobrenadante y se incubó con DNAsa 200 µg/ml (Ambion, Thermofisher) y RNAsa 100 µg/ml (Merck Millipore) durante toda la noche, posteriormente se incubó con 500 µl de proteinasa K (Invitrogen, Thermofisher) a 1 mg/ml a 60°C por 1,5 horas. Se homogeneizó en 1,5 ml de TRIzol y 400 µl de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. A continuación, se centrifugó a 3.900 x g por 10 min. Se recuperó la fase superior acuosa, y la fase inferior orgánica se lavó con 1 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q libre de pirógeno para recuperar un mayor volumen de la fase acuosa. Las fases acuosas se liofilizaron durante toda la noche (Labconco, Merck). El liofilizado se disolvió en 0,375 M de cloruro de magnesio en etanol 95% frío, se centrifugó a 4.700 x g por 5 min a 4°C y se recuperó el precipitado.

## **5.3 Electroforesis de LPS de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, ΔPG1051 y CΔPG1051 y tinción con plata.**

Una vez obtenido el LPS, se visualizó en geles de poliacrilamida teñidos con plata (Marolda, Lahiry, Vinés, Saldías, & Valvano, 2006). Para corroborar si los perfiles electrofóreticos del LPS purificado son los esperados (Díaz et al., 2015; Paramonov et al., 2009; Rangarajan et al., 2008), las muestras de LPS se separaron en geles

de poliacrilamida al 14% usando un sistema de tampón Tricina SDS. En cada bolsillo se cargaron 270 µg de LPS resuspendido en buffer de carga 2X, y se corrió a 50V por 50 min y a 150V por 90 min.

Los geles se tiñeron de plata como describe Tsai (Tsai, 1982); brevemente, el gel se sumergió el gel en solución fijadora (H<sub>2</sub>O, EtOH y HAc) toda la noche en agitación constante, a continuación, se incubaron 10 min en solución de metaperyodato de sodio, se lavó 3 veces por 10 min con 200 ml de agua destilada, posteriormente se incubó 15 min en una solución de nitrato de plata, se lavó 3 veces por 10 min con 200 ml de agua destilada, finalmente se agregó solución de revelado y se detuvo la reacción lavando con agua. Los geles fueron fotografiados con Foto documentador (Bruker).

#### **5.4 Identificación de contaminantes en el LPS purificado de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, ΔPG1051 y CAPG1051.**

Para descartar contaminación con proteínas, se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford. Se mezclaron 10 µl de la muestra de interés con 300 µl de reactivo de Bradford, se mezcló suavemente con vórtex e incubó a temperatura ambiente por 30 min, y se midió la absorbancia a 595 nm (Synergy HT, Biotek).

También se realizó una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 2% para descartar contaminación con ADN y/o ARN en el LPS purificado. El gel al 2% p/v en buffer TAE 1X y 3 µl de Gel Red, se cargaron la misma cantidad de cada muestra y se usó un estándar de peso molecular de 100 pb (Bioline).

### **5.5 Diferenciación de macrófagos a partir de células monocíticas humanas THP-1.**

Las células monocíticas humanas THP-1 (ATCC TIB-202) se cultivaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  de células por pocillo en placa de 6 pocillos (Falcon) en 2 ml de medio RPMI 1640 (Corning, New York, NY, USA) suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100  $\mu\text{g/ml}$ , piruvato de sodio 1 mM, 2- mercaptoetanol 0,05 mM, glucosa 4500 mg/l y suero fetal bovino al 10%. Las células THP-1 se diferenciaron a macrófagos mediante estimulación con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 100 nM por 24 horas a 37°C en una atmósfera humedecida de CO<sub>2</sub> 5%. Posteriormente, las células no adheridas fueron removidas, y las adheridas se lavaron con medio RPMI y se incubaron por 24 horas (Lund et al., 2016; Takashiba et al., 1999).

### **5.6 Estimulación de macrófagos con LPS de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, $\Delta\text{PG1051}$ y $\text{C}\Delta\text{PG1051}$ .**

Las células monocíticas humanas THP-1 ya diferenciadas a macrófagos, se estimularon por 24 horas con los LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50,  $\Delta\text{PG1051}$  y  $\text{C}\Delta\text{PG1051}$  en concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  resuspendidos en H<sub>2</sub>O Mili-Q libre de pirógenos (Lund et al., 2016; Takashiba et al., 1999), extraídos y purificados según se describió en el punto anterior. Como controles positivos, se utilizaron LPS comerciales de *E. coli* (Sigma) 100 ng/ml y LPS de *P. gingivalis* 33277 (Invivogen) 10  $\mu\text{g/ml}$ , y como control negativo medio sin LPS.

La estimulación de macrófagos fue realizada en tres ocasiones por triplicado con LPS de cepas de *P. gingivalis* W50,  $\Delta\text{PG1051}$  y  $\text{C}\Delta\text{PG1051}$ , además de los LPS comerciales *E. coli* y *P. gingivalis* 33277.

### 5.7 Perfil de polarización de macrófagos y niveles de citoquinas asociadas.

Se caracterizó la diferenciación M1/M2 mediante citometría de flujo. Para obtener las células adheridas a la placa se removieron utilizando un “*scraper*”, se concentraron en 200  $\mu$ l de PBS 1X estéril, se llevaron a una placa de 96 pocillos fondo en “V” y se lavaron 2 veces con 100  $\mu$ l de PBS 1X. Se marcó la superficie celular con sonda de viabilidad celular FVD (1:1000) en PBS 1X (eBioscience) durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente, posteriormente se lavaron las células con 100  $\mu$ l de PBS/SFB 2%. Se marcó la superficie celular con diluciones apropiadas de anticuerpos monoclonales anti CD64 Brilliant Violet 510 y CD80 FITC para M1, y CD163 PE/Cy7 y CD206 Brilliant Violet 421 para M2 (Biolegend, San Diego, CA, USA) en 100  $\mu$ l de PBS/SFB 2% por 30 min a 4°C y en oscuridad. Se lavó 2 veces con 100  $\mu$ l de PBS/SFB 2%. Las células fueron fijadas con 100  $\mu$ l paraformaldehído 2% (Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El análisis por citometría de flujo se realizó en un equipo LSR Fortessa X-20®; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA y con el software Flow Jo V10 (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Los niveles de citoquinas secretadas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 (M1) e IL-10 (M2) se determinaron mediante ensayo ELISA/Multiplex comercial (Human Magnetic Luminex assay, R&D Systems), a partir del sobrenadante de los macrófagos estimulados con LPS purificados. Se agregaron los sobrenadantes a la placa de 96 pocillos además del *cocktail* de micropartículas magnéticas conjugadas a anticuerpo, se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente protegidas de la luz y con agitación constante. Se lavaron y se agregaron el *cocktail* de anticuerpo de detección conjugado a biotina a cada pocillo, y se incubaron bajo las mismas condiciones por 1 hora. Se lavaron y agregaron estreptavidina conjugada a fluoróforo y se incubaron bajo las mismas condiciones por 30 minutos. Se analizaron en un lector de microplacas y se expresaron como concentración por  $\mu$ l de sobrenadante.

### **5.8 Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos se analizaron bajo la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos. Los análisis inferenciales se realizaron con la prueba de chi cuadrado y Kruskal-Wallis. El análisis estadístico se realizó con STATA 12® (StataCorpLP, Texas, EE. UU). Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU).



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Extracción y purificación de LPS de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051.

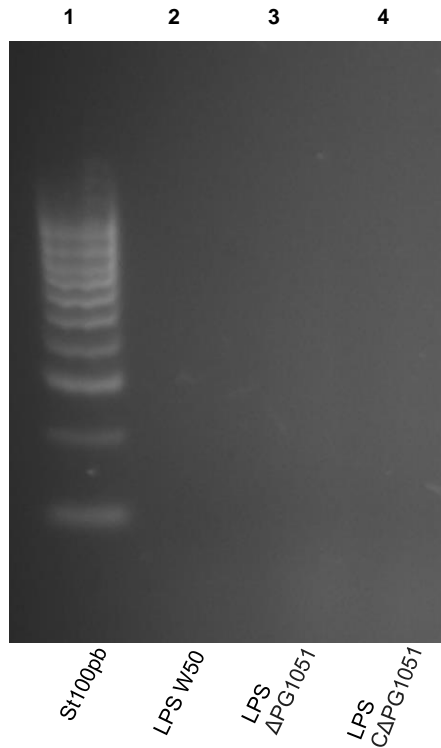
El protocolo de extracción y purificación de LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50,  $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051 fue realizado según la metodología mencionada anteriormente. En la Tabla 1 se muestran las masas de LPS obtenidas a partir de cada uno de los tres cultivos independientes de las cepas de *P. gingivalis* (numerados del 1 al 3), los cuales fueron solubilizados en H<sub>2</sub>O Mili-Q libre de pirógeno, para luego ser utilizados para estimular macrófagos. Todas las muestras de LPS resultaron ser puras sin contaminación con proteínas (Tabla 1) ni ácidos nucleicos (Tabla 1, Figura 2).

Tabla 1: Información de los LPS purificados de las cepas de *Porphyromonas gingivalis* (W50,  $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051).

Cepa	Densidad Óptica del cultivo inicial (DO)	Masa de LPS purificado (mg)	Concentración final de LPS purificado (mg/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	Presencia de ácidos nucleicos
W50 (1)*	1,195	2,15	20	0	NO
$\Delta$ PG1051 (1)*	1,046	1,75	20	0	NO
C $\Delta$ PG1051 (1)*	1,180	3,3	20	0	NO
W50 (2)*	1,290	1,1	30	0	NO
$\Delta$ PG1051 (2)*	1,315	4,34	30	0	NO
C $\Delta$ PG1051 (2)*	1,360	1,17	30	0	NO
W50 (3)*	0,622	1,5	23	0	NO
$\Delta$ PG1051 (3)*	0,700	1,83	30	0	NO
C $\Delta$ PG1051 (3)*	0,625	1,83	30	0	NO

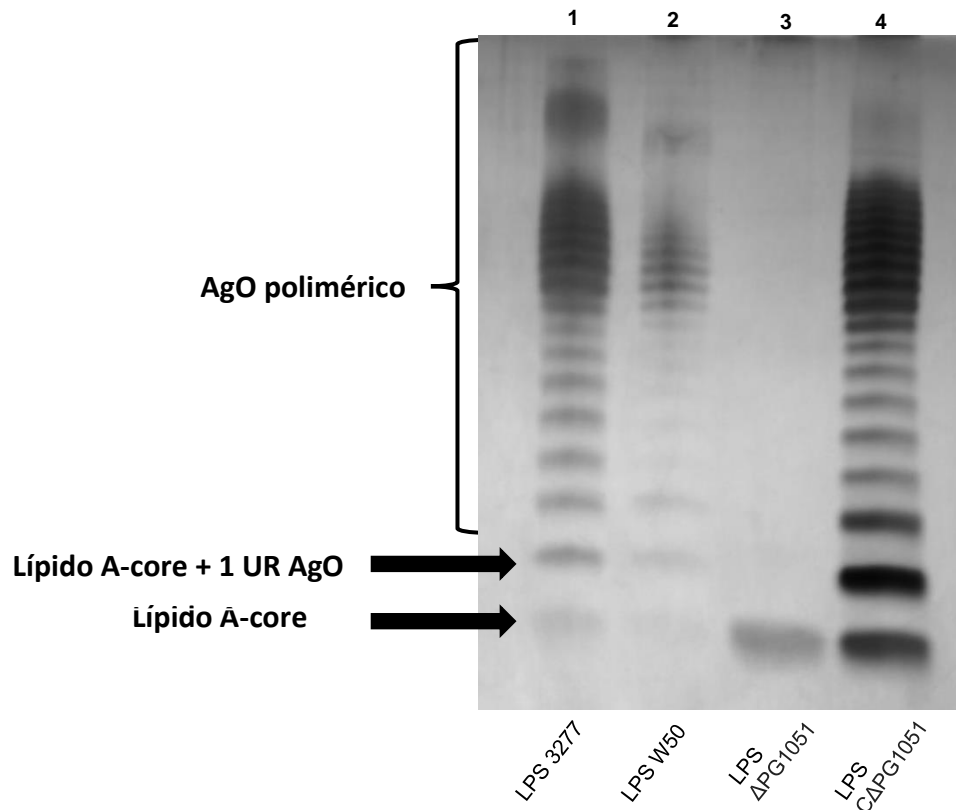
\*Los números (1, 2 y 3) indica el cultivo de cada una de las cepas de *P. gingivalis* a partir de los cuales fue extraído y purificado el LPS. Cada muestra de LPS obtenido proviene de cultivos independientes.

En la Figura 1, se observa una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa teñido con Gel red. En todos los LPS purificados se descartó la presencia de ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN.



**Figura 2:** Detección de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa para muestras de LPS purificado de cepas de *P. gingivalis*. Carril 1: estándar de DNA de peso molecular 100pb, carril 2: LPS de cepa de *P. gingivalis* W50, carril 3: LPS de cepa  $\Delta$ PG1051 y carril 4: LPS de cepa C $\Delta$ PG1051. Se observa que los LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50,  $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051 no presentaron bandas correspondientes a ácidos nucleicos.

Se confirmaron los perfiles electroforéticos de los LPS de las cepas de *P. gingivalis* purificados. Se observó que todos los LPS obtenidos tanto de las cepas silvestres *P. gingivalis* 33277 y W50, así como la cepa mutante complementada C $\Delta$ PG1051 presentaron un LPS completo constituido por lípido A, core y moléculas de AgO de alto y bajo peso molecular. En contraste, la cepa  $\Delta$ PG1051 mutante en el gen de la ligasa del AgO, presentó un LPS constituido solo por lípido A-core (Figura 3).

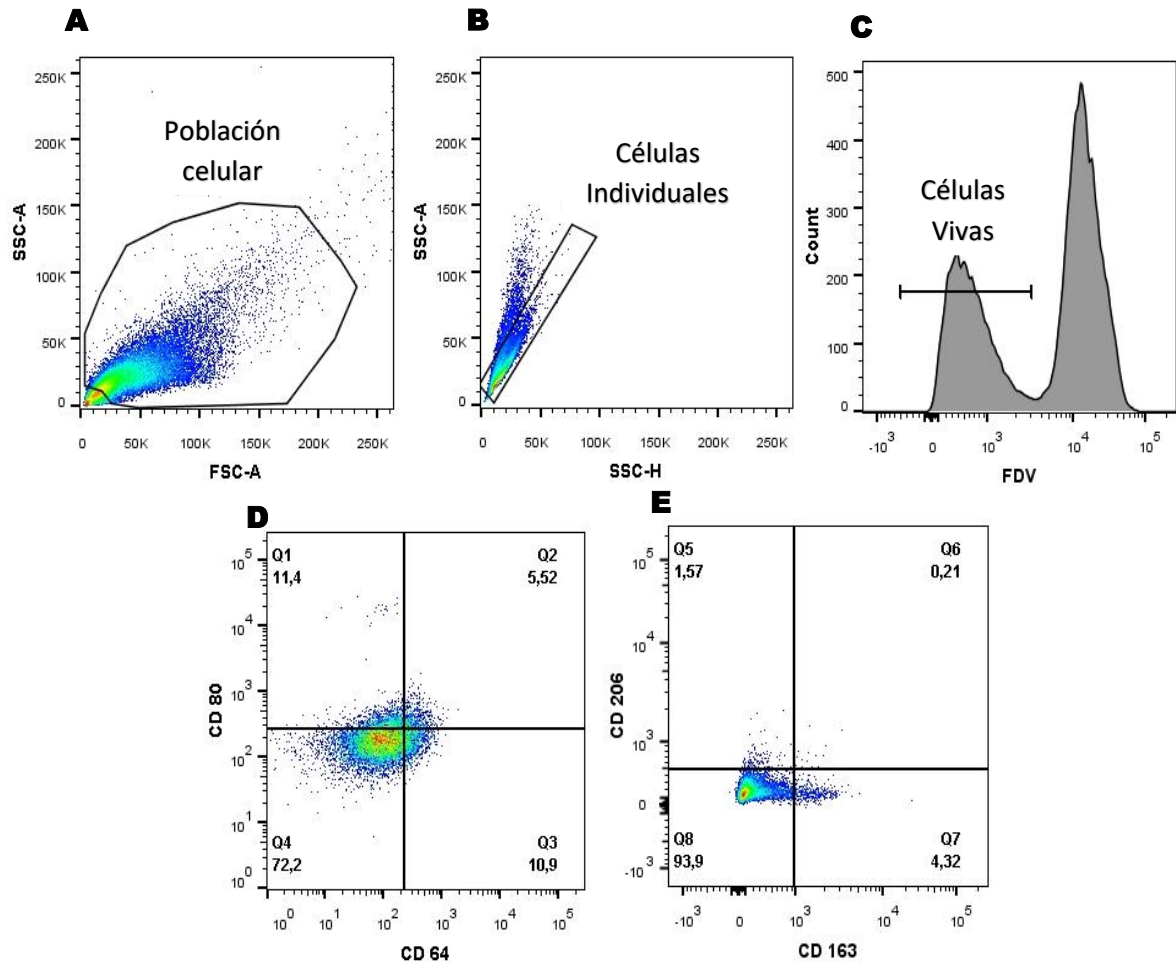


**Figura 3:** Perfiles de LPS de cepas de *P. gingivalis* analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata. Se muestra en los carriles 1: LPS de cepa *P. gingivalis* 33277, carril 2: LPS de cepa de *P. gingivalis* W50, carril 3: LPS de cepa  $\Delta$ PG1051 y carril 4: LPS de cepa C $\Delta$ PG1051

### 6.2 Perfil de polarización de macrófagos estimulado con LPS de cepas de *Porphyromonas gingivalis* con y sin antígeno O, evaluado mediante marcadores de superficie específicos M1 M2

En la Figura 4, se muestran los perfiles de polarización de los macrófagos THP-1 estimulados con LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50,  $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051 sobre la base de sus marcadores de superficie. Se observa las características de la población celular en base a los parámetros de dispersión de luz, dispersión frontal (FSC) versus la dispersión lateral (SSC), de este modo se descartan células muertas y fragmentos celulares por sus características de tamaño y complejidad (Figura 4A). Posteriormente, sobre las células seleccionadas desde R1, se

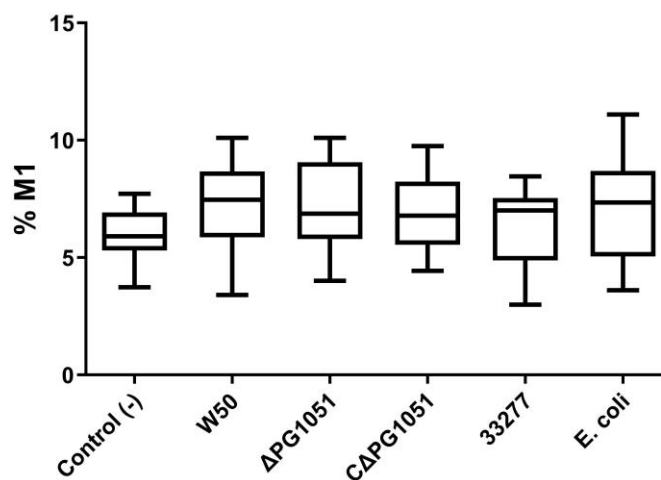
seleccionaron las células individuales (Figura 4B), luego se seleccionaron las células vivas (células negativas para el marcaje con sonda de viabilidad celular FDV) (Figura 4C). Finalmente, las células seleccionadas fueron analizadas según la expresión de los marcadores de superficie para perfil de diferenciación M1 (CD64+CD80+) y M2 (CD163+CD206+) (Figuras 4D y 4E).



**Figura 4:** Perfiles de polarización según marcadores de superficie de células THP-1 estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 durante 24 horas. Se muestran los dot plot e histogramas representativos. A: Dispersión frontal (FSC) vs dispersión lateral (SSC). B: Células unitarias. C: Selección de células vivas mediante marcaje con sonda de viabilidad celular FDV. D: Doble marcaje CD64+CD80+ para M1. E: Doble marcaje CD163+CD206+ para M2.

### 6.2.1 Porcentaje de macrófagos M1 y M2 estimulados con LPS de cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, $\Delta$ PG1051 y C $\Delta$ PG1051.

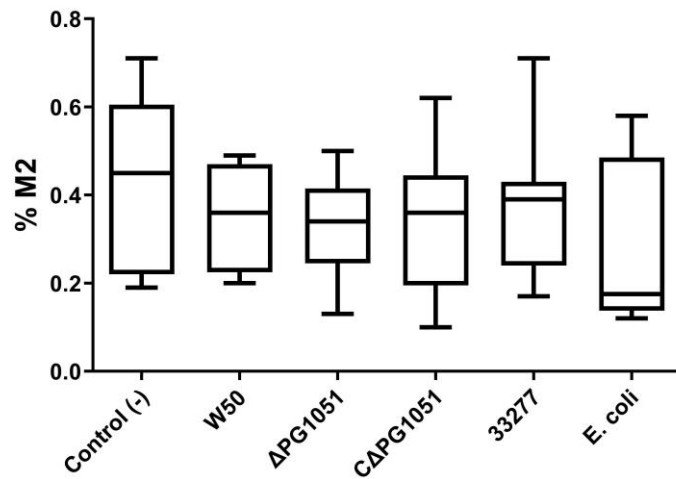
El porcentaje de macrófagos doble positivos CD64+CD80+ (M1) fue de un 7,5% sobre el total de células estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50, mientras que al estimular con LPS de la cepa mutante  $\Delta$ PG1051 se observó un 6,9%. Se observa que todos los LPS de *P. gingivalis* inducen un perfil de diferenciación M1 similar e independiente de la presencia de AgO ( $p > 0,05$ ). (Figura 5).



**Figura 5:** Porcentaje de células doble positivas CD64+CD80+ (perfil M1) del total de células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y control sin estímulo. Las cajas y bigotes representan el porcentaje de células que expresan CD64+CD80+. No se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).  $n=9$ .

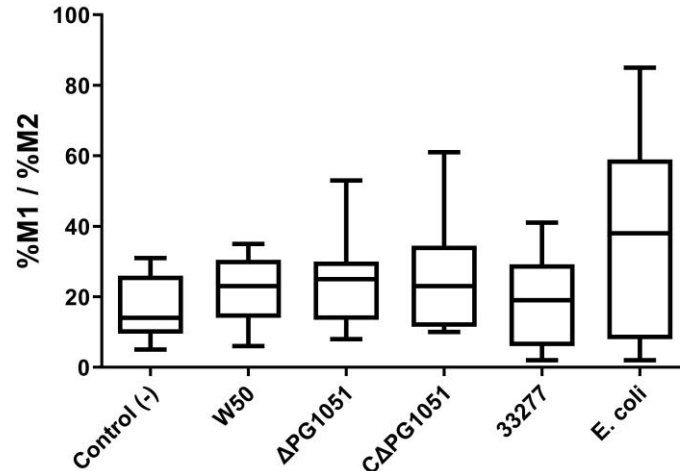
Todos los LPS purificados a partir de las cepas de *P. gingivalis* indujeron perfiles de diferenciación M2 similares, independiente de la presencia de AgO. Así, el porcentaje de macrófagos doble positivos CD163+CD206+ (M2) del total de células estimuladas fue 0,36% para la estimulación con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50,

0,34% para la estimulación LPS de la cepa  $\Delta$ PG1051 carente de AgO ( $p>0,05$ ) (Figura 6).



**Figura 6:** Porcentaje de células doble positivas CD163+CD206+ (perfil M2) del total de células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y control sin estímulo. Las cajas y bigotes representan el porcentaje de células que expresan CD163+CD206+. No se observan diferencias significativas ( $p>0,05$ ).  $n=9$ .

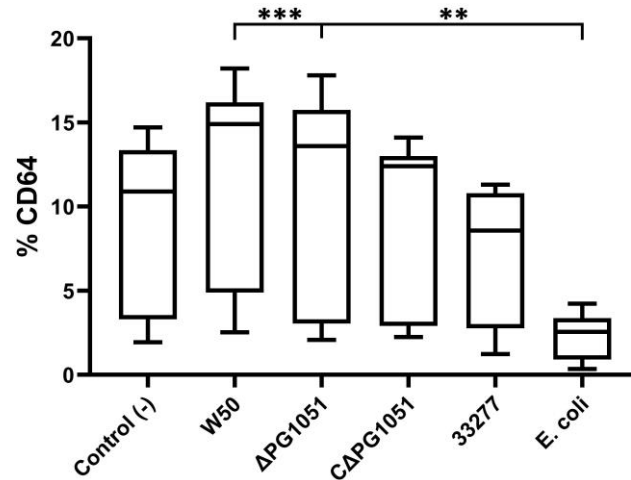
Tampoco se observan diferencias significativas en relación a la razón del porcentaje M1/M2, para la estimulación con LPS de la cepa de *P. gingivalis* W50 (LPS completo) que fue de un 23, mientras que para la estimulación con LPS de la cepa  $\Delta$ PG1051 mutante en el gen *PG1051* fue de 25 ( $p>0,05$ ) (Figura 7).



**Figura 7:** Razón de porcentaje M1/M2 en células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y control sin estímulo. Las cajas y bigotes representan la razón de porcentaje M1/M2 de células. No se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).  $n=9$ .

### 6.2.2 Porcentaje de macrófagos positivos para marcadores simples M1 y M2 estimulados con LPS de cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, ΔPG1051 y CAPG1051.

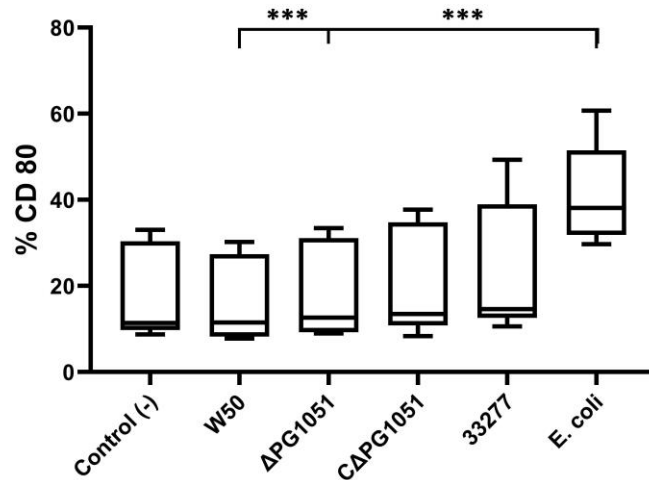
El porcentaje de macrófagos CD64+ (M1) del total de células estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 fue 14,9%, y fue de 13,6% cuando se estimuló con LPS de cepa mutante para el gen *PG1051* carente de AgO, ambos fueron significativamente mayores en comparación con el 2,6% de células CD64+ observadas luego de la estimulación con LPS de *E. coli* ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente) (Figura 8).



**Figura 8:** Porcentaje de expresión del marcador de superficie CD64+ específico para M1 en el total de células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y sin estímulo. Las cajas y bigotes representan el porcentaje de células que expresan CD64+. Se observan diferencias significativas (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).  $n=9$ .

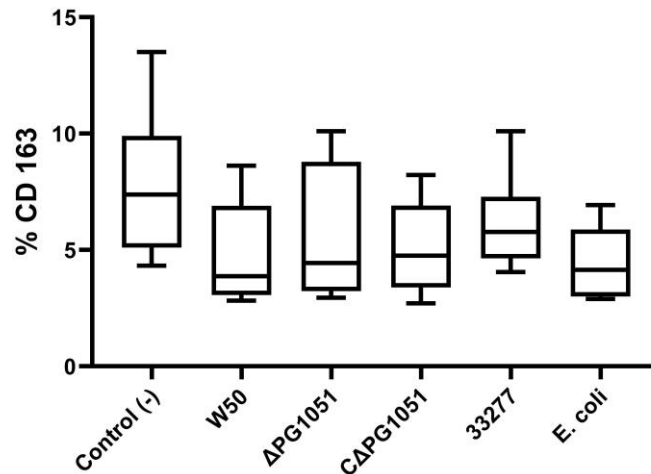
El porcentaje de macrófagos CD80+ (M1) del total de células estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 (LPS completo) fue de 11,5%, mientras que en aquellas estimuladas con LPS de la cepa  $\Delta$ PG1051 (carente de AgO) fue de 12,6%; siendo significativamente menor en comparación con el 38,1% de células CD80+ obtenidas luego de la estimulación con LPS de *E. coli* ( $p < 0,001$ ). Por lo tanto, se observaron niveles similares de expresión del marcador CD80+ (M1) en células estimuladas con los LPS de cepas de *P. gingivalis* e independiente de la presencia del AgO (Figura 9).





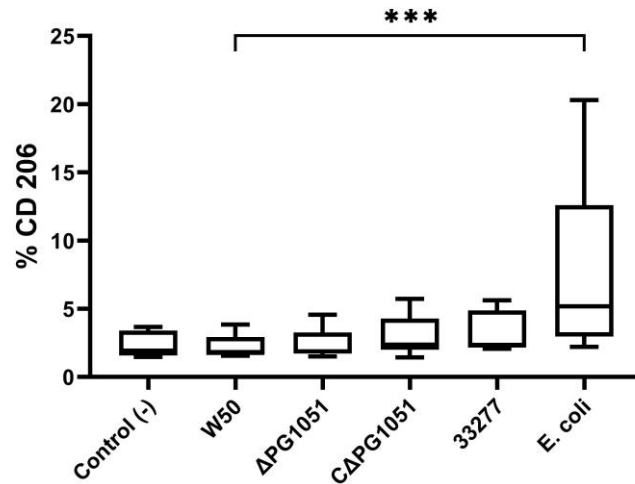
**Figura 9:** Porcentaje de expresión del marcador de superficie CD80+ específico para M1 en el total de células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y en el control sin estímulo (\*\* $p < 0,001$ ). Las cajas y bigotes representan el porcentaje de células que expresan CD80+. Se observan diferencias significativas (\*\* $p < 0,001$ ).  $n=9$ .

El porcentaje de macrófagos CD163+ (M2) del total de células estimuladas no mostró diferencias significativas al comparar ninguno de los grupos estimulados con los distintos LPS. Solamente, se observó una tendencia hacia la disminución de células CD163+ al estimular con LPS de las cepas W50, ΔPG1051 y CΔPG1051 en comparación con el control no estimulado ( $p > 0,05$ ) (Figura 10).



**Figura 10:** Porcentaje de expresión del marcador de superficie CD163+ específico para M2 en el total de células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y sin estímulo. Las cajas y bigotes representan el porcentaje de células que expresan CD163+. No se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).  $n=9$ .

El porcentaje de macrófagos CD206+ (M2) del total de células estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 (LPS completo) fue de 1,8%, este valor fue significativamente menor comparado con el 5,2% de células CD206+ observadas luego de estimular con LPS de *E. coli*. Finalmente, se observaron niveles similares de expresión de CD206+ (M2) en células estimuladas con LPS de las distintas cepas de *P. gingivalis* e independiente de la presencia de AgO ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ) (Figura 11).

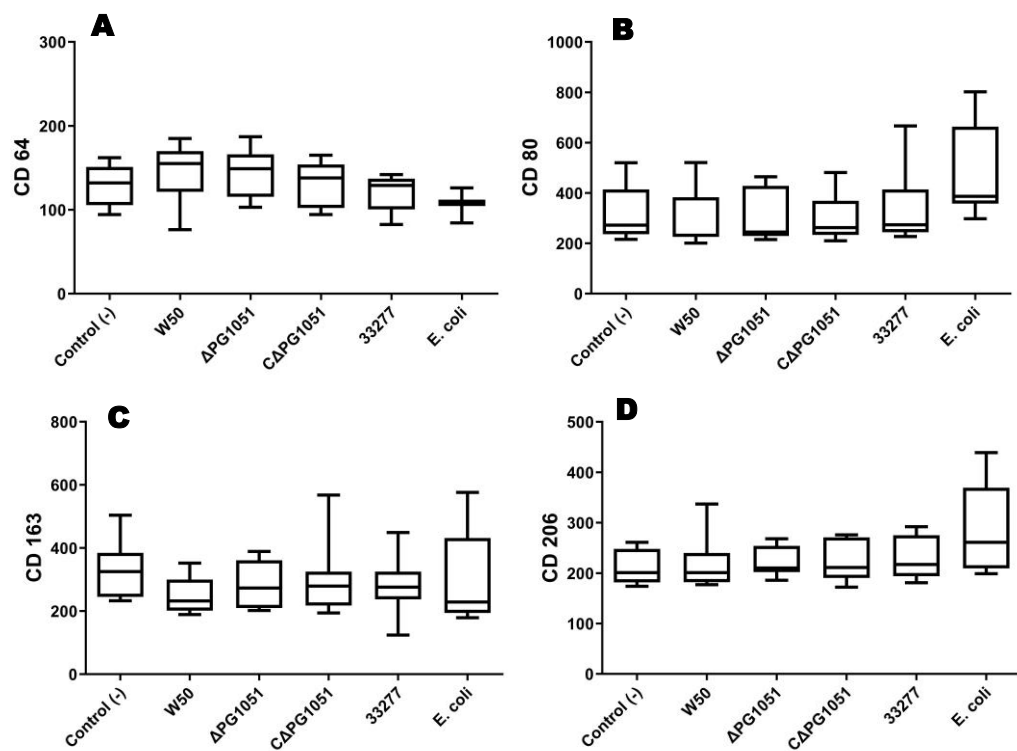


**Figura 11:** Porcentaje de expresión del marcador de superficie CD206+ específico para M2 en el total de células estimuladas con distintos LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y sin estímulo. Las cajas y bigotes representan el porcentaje de células que expresan CD206+. Se observan diferencias significativas (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).  $n=9$ .

En conjunto, los resultados del análisis individual de la expresión de cada marcador de superficie específicos ya sea para M1 (CD64 y CD80), como para M2 (CD163 y CD206) demuestran que el AgO del LPS de *P. gingivalis* no es relevante en los perfiles de diferenciación de macrófagos THP-1.

### 6.2.3 Determinación de la expresión de marcadores M1 M2 mediante intensidad media de fluorescencia (IFM) en células estimuladas con LPS de cepas de *P. gingivalis* y LPS de *E. coli*.

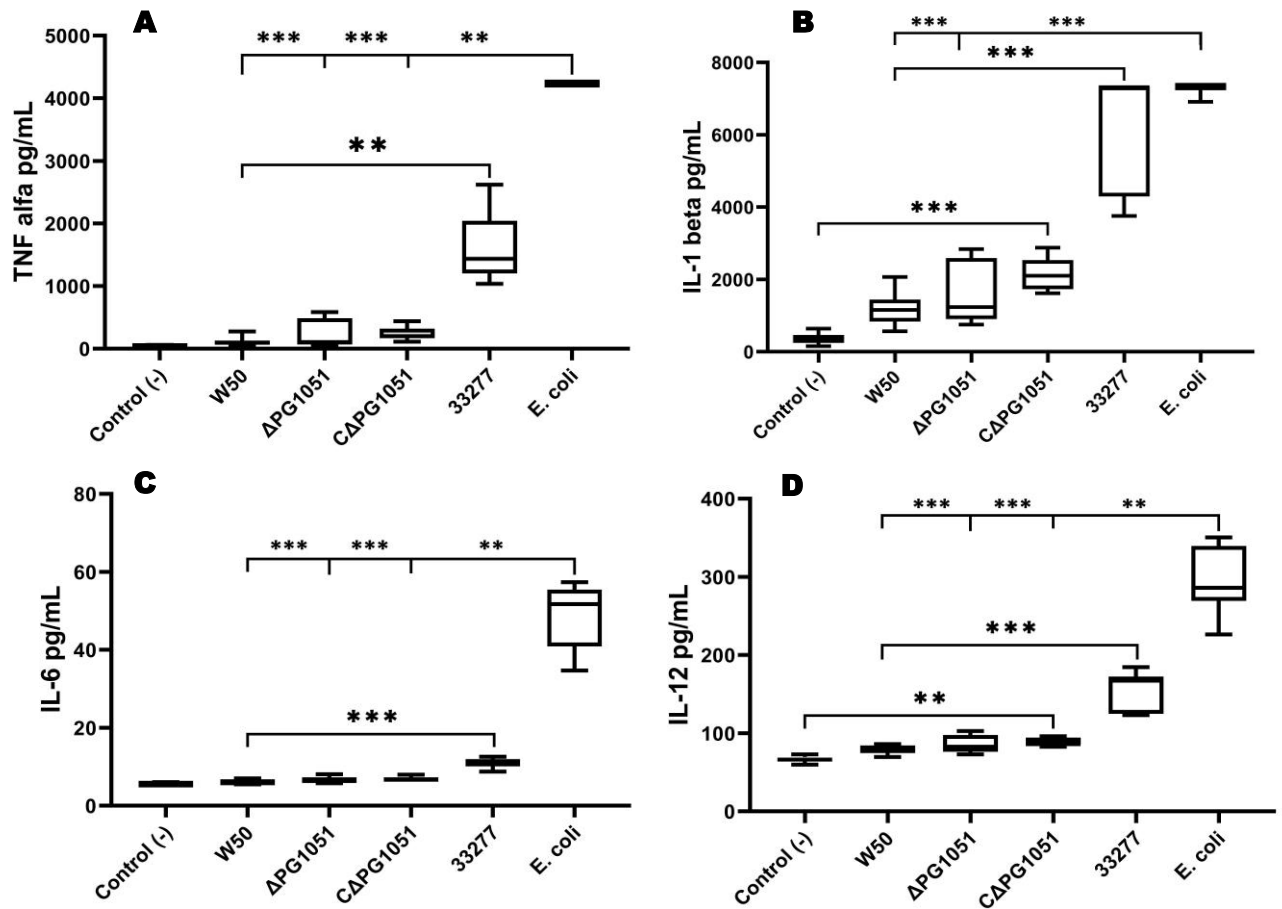
En cuanto a la IMF de los marcadores de superficie M1 (CD64 y CD80) y M2 (CD163 y CD206), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las condiciones experimentales (Figura 12).



**Figura 12:** Expresión mediante IFM de marcadores unitarios específicos M1 y M2. A: CD64, B: CD80, C: CD163 y D: CD206. Las cajas y bigotes representan los niveles expresados de IFM. No se observan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).  $n=9$ .

### **6.3 Niveles de citoquinas asociadas a perfiles de diferenciación M1 M2 secretadas por macrófagos estimulados con LPS de cepas de *Porphyromonas gingivalis* W50, ΔPG1051 y CΔPG1051.**

En relación a los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12, citoquinas asociada al perfil M1, no existen diferencias entre los grupos estimulados con las cepas de *P. gingivalis* ya sea en presencia (W50 y CΔPG1051) o ausencia de AgO (ΔPG1051), los valores obtenidos en las células estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 fueron 99,9, 1.156, 6,1 y 79,5 pg/ml, con LPS de la cepa mutante ΔPG1051 fueron 98,9, 1.236, 6,4 y 66,3 pg/ml, y con LPS de la cepa mutante complementada CΔPG1051 fueron 202,6, 2.136, 6,8 y 86,2 pg/ml respectivamente. Los cuatro grupos mencionados anteriormente presentaron niveles significativamente menores para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 comparado con el grupo de células estimuladas con LPS de *E. coli* (4234, 7.335, 51,7 y 286,2 pg/ml), respectivamente ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ) (Figura 13).

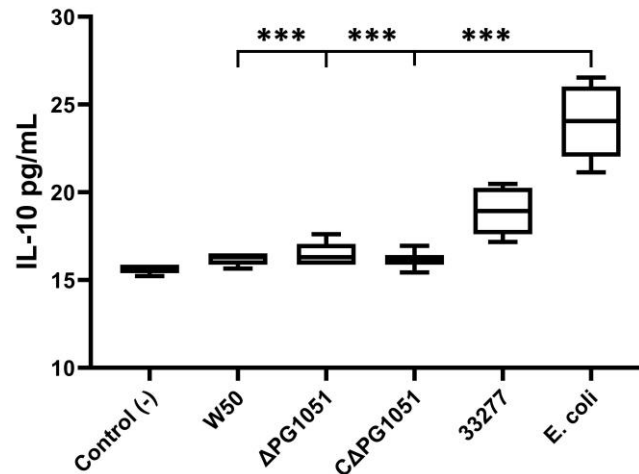


**Figura 13:** Niveles de expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 (pg/ml) en células estimuladas con LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y sin estímulo. Las cajas y bigotes representan los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias. A: TNF- $\alpha$ , B: IL-1 $\beta$ , C: IL-6 y D: IL-12. Se observan diferencias significativas (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).  $n=9$ .

En conjunto, los resultados presentados en las Figura 13, demuestran que existe una tendencia hacia el aumento en los niveles de las citoquinas asociadas a un perfil de diferenciación de macrófagos M1 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12), en macrófagos estimulados con LPS de las cepas de *P. gingivalis*, tanto de la cepa W50 (LPS completo), como de la cepa  $\Delta$ PG1051 mutante carente de AgO, comparado con el control sin estímulo ( $p > 0,05$ ).

En consecuencia, al no existir diferencias en el perfil de diferenciación de macrófagos THP-1 en la estimulación con LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50 que presenta LPS con AgO, y con la cepa  $\Delta$ PG1051 mutante carente de AgO, el AgO no sería un determinante en el perfil de diferenciación de macrófagos en nuestro modelo de estudio.

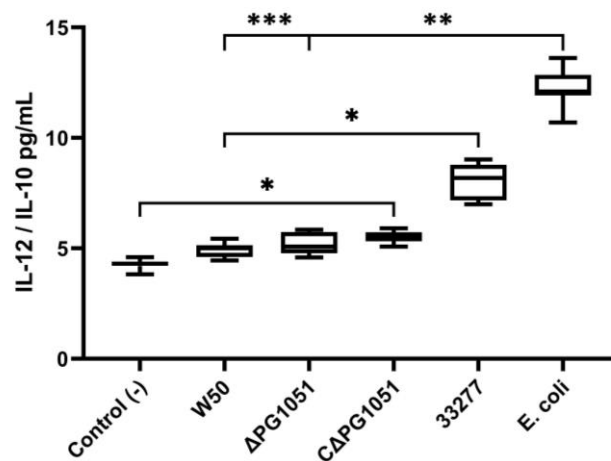
A continuación, analizamos los niveles de IL-10, citoquina asociada al perfil M2. En la Figura 14 se observa que los niveles de IL-10 en la estimulación con LPS de la cepa de *P. gingivalis* W50 fue 16,3 pg/ml, en la estimulación con la cepa carente de AgO  $\Delta$ PG1051 fue 16,3 pg/ml, y en la estimulación con la cepa  $\Delta$ PG1051 mutante complementada para el gen *PG1051* fue 16,3 pg/ml, indujeron niveles significativamente menores que la estimulación con LPS de *E. coli* (24,1 pg/ml). Cabe destacar que no se observaron diferencias en los patrones de expresión de citoquina dependientes de AgO ( $p < 0,001$ ).



**Figura 14:** Niveles de expresión de IL-10 (pg/ml) en células estimuladas con LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y sin estímulo. Las cajas y bigotes representan los niveles de expresión de IL-10. Se observan diferencias significativas (\*\*\*) $p < 0,001$ ). n=9.

La razón IL-12/IL-10, para analizar el perfil proinflamatorio/antiinflamatorio de los macrófagos, en base a los niveles de secreción de citoquinas pro (IL-12) y antiinflamatorias (IL-10) fue significativamente menor en células estimuladas con LPS de la cepa de *P. gingivalis* W50 (5) comparada con células estimuladas con LPS comercial de la cepa de *P. gingivalis* 33277 (8,2) y con la estimulación con LPS de *E. coli* (12,1). Para las células estimuladas con LPS de la cepa ΔPG1051 mutante carente de AgO fue 5,1, también fue significativamente menor en comparación con la estimulación con LPS de *E. coli*. Por tanto, el AgO no tendría un rol determinante en el perfil de diferenciación de macrófagos ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ ) (Figura 15).





**Figura 15:** Razón IL12/IL10 en células estimuladas con LPS de cepas de *P. gingivalis*, LPS de *E. coli* y sin estímulo. Las cajas y bigotes representan la razón IL12/IL10 de las células. Se observan diferencias significativas (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).  $n=9$ .

## 7. DISCUSIÓN

Uno de los factores de virulencia de mayor relevancia de *P. gingivalis* es el LPS, y específicamente el AgO, el elemento más externo y variable en la estructura de dicha molécula. En particular, se ha determinado que ciertos tipos celulares (CEGs) responden diferencialmente al ser infectadas con *P. gingivalis* con y sin AgO. Así, se demostró que la región de AgO es esencial en el incremento de la viabilidad y proliferación de CEGs, así como en la inhibición de la apoptosis y en la respuesta mediada por TLR-4 (Soto et al., 2016).

Sin embargo, aún no existe evidencia que demuestre un efecto del AgO de *P. gingivalis* sobre macrófagos. Es por eso que en este trabajo nos propusimos evaluar si el AgO estimula la diferenciación de macrófagos humanos hacia algún perfil de polarización en particular.

Para lograr una efectiva estimulación de los macrófagos THP-1, un punto fundamental dentro de este trabajo fue la extracción y purificación del LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50 (LPS completo),  $\Delta$ PG1051 (mutante carente de AgO) y  $\Delta$ PG1051 (mutante complementada para el gen *PG1051*), con énfasis en la obtención de LPS libre de contaminantes. En particular, descartamos la presencia de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), debido a que se ha demostrado que tanto ácidos nucleicos como proteínas pueden generar la respuesta inmunitaria por parte de macrófagos mediante la activación de TLRs (Hajishengallis & Sahingur, 2014; Ma et al., 2019). En particular, existe evidencia que demuestra que la presencia de lipoproteínas activa la respuesta de TLR-2, receptor que también reconoce la presencia de AgO en la molécula de LPS de *P. gingivalis* en la estimulación de CEGs lo que conlleva a la posterior expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12 y TNF $\alpha$ ) mediante la vía de activación NF- $\kappa$ B en neutrófilos (Soto et al., 2016), Kawai & Akira, 2006; Medzhitov, 2001).

La extracción y purificación del LPS se realizó siguiendo el protocolo de extracción con Trizol (Eugene & Hackett, 2000), el cual fue necesario modificar debido a que al momento de confirmar la ausencia de ácidos nucleicos mediante el gel de agarosa, aún se podían observar ácidos nucleicos (datos no mostrados). Para

eliminar estos contaminantes, se contemplaron dos tratamientos. Por un lado, se añadió una etapa de sonicación posterior a la resuspensión del pellet bacteriano en 1 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q libre de pirógeno. Luego de la sonicación, se centrifugó para descartar todas las bacterias no lisadas y conservar sólo las macromoléculas en el sobrenadante. En segundo lugar, se incorporó una etapa de incubación del sobrenadante con ADNsa y ARNsa (Rezania et al., 2011). El resultado, fue la obtención de un LPS puro como se observa en las Figuras 2 y 3. Nuestra decisión por realizar la extracción del LPS de *P. gingivalis* mediante sonicación y centrifugación, se debe a que fueron probados distintos protocolos de extracción de LPS utilizados en la literatura, y a su vez algunas combinaciones de ellos, como, por ejemplo, uno de los métodos muy utilizados es la extracción con fenol acuoso caliente (Davis Jr & Goldberg, 2012). Finalmente, luego de realizar una serie de protocolos, pudimos elegir el método que nos brindó mejores resultados, sobre la base de lo observado en los geles de agarosa y poliacrilamida.

Para analizar el perfil de polarización de los macrófagos humanos de línea celular THP-1 tratados con LPS mediante citometría de flujo, se utilizó el doble marcaje positivo para los marcadores de superficie M1 (CD64+CD80+) y M2 (CD163+CD206+) como se sugiere en la literatura (Ambarus et al., 2012). Usando el doble marcaje positivo para M1 y M2 no se obtuvieron diferencias significativas entre LPSs obtenidos de cepas con LPS completo y aquellas carentes de AgO (Figura 5 y 6). Solamente se observó una tendencia de polarización hacia el aumento de M1 en las células estimuladas con LPS de cepas de *P. gingivalis* y una tendencia hacia la disminución de M2 comparado con el control sin estímulo. Ambas tendencias fueron independientes de la presencia o ausencia de AgO, y se relacionaron positivamente con los resultados obtenidos en un diseño experimental en modelo murino, donde macrófagos derivados de médula ósea fueron estimulados con LPS comercial de *P. gingivalis*, teniendo como resultados una activación del perfil M1 y un bloqueo del perfil M2 (Yu, Ding, Liang, & Luo, 2018). Cabe recordar que el LPS es una molécula que tiene un importante rol en la activación clásica (M1) de macrófagos, junto con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Lam et al., 2014), por lo cual es esperable que exista una mayor tendencia de diferenciación a M1 con la estimulación de distintos LPS. Sumado a lo anterior, TNF- $\alpha$  es una citoquina

proinflamatoria secretada por macrófagos M1, y a la misma vez su presencia ayuda a la diferenciación de macrófagos hacia un perfil M1, es decir, TNF- $\alpha$  tendría una retroalimentación positiva en la polarización macrófagos M1.

Debido a la falta de resultados concluyentes utilizando el doble marcaje, se utilizó como estrategia el análisis por marcaje simple de CD64+, CD80+, CD163+ y CD206+, donde sí se observaron diferencias estadísticamente significativas. El porcentaje de CD64+ (M1) fue significativamente mayor para la estimulación con LPS de cepas de *P. gingivalis*, tanto para W50 (LPS completo), como la carente de AgO ( $\Delta$ PG1051), en comparación con LPS de *E. coli* (Figura 8). A su vez no existieron diferencias significativas entre los grupos W50 y  $\Delta$ PG1051, lo que demuestra que la presencia de AgO no tiene influencia en la expresión del marcador de superficie CD64; cabe mencionar que CD64 es un marcador M1 bien caracterizado, que desencadena respuestas proinflamatorias funcionales (Hristodorov, Mladenov, Huhn, Barth, & Thepen, 2012).

CD80 es un relevante marcador M1 que tiene como función ser un coestimulador en la activación de células T durante la presentación de antígenos (Ambarus et al., 2012; Barros et al., 2013). El porcentaje CD80+ fue significativamente menor en la estimulación con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 y LPS de cepa mutante  $\Delta$ PG1051 en comparación con la estimulación con LPS de *E. coli* (Figura 9).

En relación con los marcadores bien caracterizados M2 (CD163 y CD206), solo se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de CD206, que fue menor en la estimulación con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 (LPS completo) en comparación con la estimulación con LPS de *E. coli*, y el porcentaje de expresión fue similar entre los grupos con presencia y ausencia de AgO (Figura 11). CD206 es un receptor de lectina tipo C, que tiene como función eliminar las glicoproteínas no deseadas con alto contenido de manosa (Azad, Rajaram, & Schlesinger, 2014), y también se ha implicado en la adhesión y fusión de macrófagos en la formación de granulomas (McNally, DeFife, & Anderson, 1996). Esta diferencia podría tener un fundamento en la composición de la estructura y factores de virulencia de *P. gingivalis* W50 y *E. coli*. Al respecto, se han demostrado diferencias estructurales del lípido A en la molécula de LPS de *P. gingivalis*, donde existen diferencias en los

dos tipos de LPS. El A-LPS contiene isoformas tetra y pentaaciladas monofosforiladas que mostraron una actividad proinflamatoria reducida en comparación con el LPS total (W50 y  $\Delta$ PG1051), que contiene tanto O-LPS como A-LPS (Rangarajan et al., 2008). Sumado a lo anterior, varios estudios han demostrado que las moléculas monofosforiladas de lípidos A penta o tetraacilados tienen una actividad biológica significativamente reducida en comparación con las moléculas de lípidos A hexa acilados difosforilados típicamente producidos por *E. coli* (Bäckhed, Normark, Schweda, Oscarson, & Richter-Dahlfors, 2003; Flad, Lopnow, Rietschel, & Ulmer, 1993; Zenobia et al., 2014).

La molécula CD163 es un receptor “scavenger” para el complejo hemoglobina-haptoglobina, que también participa en la adhesión de monocitos a las células endoteliales (Davis & Zarev, 2005). Se ha demostrado que el tratamiento de los monocitos con PMA disminuye la expresión de CD163 en la superficie celular (Sulahian, Hintz, Wardwell, & Guyre, 2001; Wenzel, Roth, & Sorg, 1996). Nuestros resultados mostraron una tendencia hacia la disminución en el porcentaje de expresión de CD163 en las muestras estimuladas con LPS de cepas de *P. gingivalis* comparadas con el control sin estímulo (Figura 10).

Los resultados obtenidos respecto de los niveles de citoquinas secretadas por los macrófagos THP-1 estimulados con LPS de distintas cepas de *P. gingivalis* y *E. coli*, son los esperados según la literatura, observándose una tendencia hacia el aumento en la secreción de las citoquinas asociadas al perfil de diferenciación M1 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12) en la estimulación con LPS de las cepas de *P. gingivalis* comparado con el control sin estímulo. Lo anterior coincide con resultados obtenidos en el análisis de los marcadores de superficie (Lam et al., 2014). En cambio, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar células estimuladas con LPS de *E. coli* con aquellas estimuladas con LPS de las cepas de *P. gingivalis* W50 y  $\Delta$ PG1051. El LPS de *E. coli* produjo un aumento en la expresión de las citoquinas asociadas a M1, por lo tanto, el LPS de esta bacteria presenta un mayor potencial inmunogénico que *P. gingivalis*, independiente de la presencia de AgO. Este resultado concuerda con la literatura, donde se ha demostrado en distintos tipos celulares de que el LPS de *P. gingivalis* tiene un menor potencial inductor de citoquinas proinflamatorias que el LPS de *E. coli* (Martin, Katz, Vogel, &

Michalek, 2001; Ogawa & Uchida, 1996). Al respecto, el LPS de *E. coli* fue utilizado como un control positivo para establecer un potencial de respuesta de referencia y determinar que los resultados obtenidos para *P. gingivalis* son confiables. De modo similar a lo obtenido para el perfil de polarización según los marcadores de superficie específicos M1 y M2, no se observaron diferencias en los niveles de citoquinas M1 respecto a la presencia (W50 y CΔPG1051) o no de AgO (ΔPG1051) en la estructura de la molécula de LPS de *P. gingivalis* (Figura 13).

Esta diferencia inmunogénica entre *P. gingivalis* y *E. coli*, como se mencionó anteriormente, se puede deber a las diferencias estructurales que presentan ambas bacterias en relación al lípido A de sus respectivos LPS. Esta importante diferencia en la estructura del lípido A, sería el fundamento de la diferencia en la activación de los receptores TLRs en la literatura, donde se ha reportado que el LPS de *P. gingivalis* puede utilizar tanto TLR-2 como TLR-4 (principalmente TLR-2 en células THP-1) para inducir la producción de citoquinas, mientras que el LPS de *E. coli* solo estimula la producción de citoquinas a través de la activación de TLR-4 en células THP-1 (Diya Zhang, Lili Chen, Shenglai Li, Zhiyuan Gu, & Jie Yan, 2008). Posteriormente a la unión del LPS al receptor TLR la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias se puede desencadenar mediante la activación de varias vías de señalización intracelular que incluyen a NF-κβ, quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y proteínas quinasas p38 activadas por mitógenos (p38MAPK) (Ip & Davis, 1998; Lu, Yang, Jiang, Wang, & Zhu, 2001; P. L. Wang, Azuma, Shinohara, & Ohura, 2000; Zhou et al., 2005). Zhang y cols. (2008) demostraron que si bien el LPS de *E. coli* activa las tres vías de señalización para la producción de citoquinas, NF-κβ y p38MAPK son las principales para la producción de citoquinas. Además, se sugiere que la vía de señalización JNK es la principal utilizada por el LPS de *P. gingivalis* en células THP-1 para sintetizar citoquinas, resultado que difiere notablemente del LPS de *E. coli* (Diya, Lili, Shenglai, Zhiyuan, & Jie, 2008).

Como proyección de este trabajo, y ante la nula información que se tiene sobre el rol del AgO en la respuesta mediada por TLRs en macrófagos, sería interesante evaluar si existe alguna diferencia tanto en la activación de TLR-2 como TLR-4, y de igual modo evaluar si existen diferencias en relación con la vía de señalización utilizada en la producción de citoquinas.

Otro resultado interesante con respecto a las citoquinas asociadas a M1 fue que existieron niveles significativamente menores al comparar las células estimuladas con LPS de cepa de *P. gingivalis* W50 con las células estimadas con LPS comercial de *P. gingivalis* 33277. Al analizar los factores de virulencia de ambas cepas de referencia, se sabe que la cepa de *P. gingivalis* W50 cuenta con cápsula (antígeno K) y no cuenta con fimbria mayor (FimA), contrariamente a la cepa de referencia de *P. gingivalis* 33277 que no cuenta con antígeno K como factor de virulencia pero sí con FimA (Bostanci & Belibasakis, 2012). Se ha demostrado en fibroblastos gingivales humanos que la cepa sin antígeno K es un inductor más potente de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Brunner et al., 2010); a su vez existe evidencia que demuestra que FimA tiene como propiedad la inducción de citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas de la matriz (MMPs), tales como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y MMP-9 en distintos tipos celulares (Jotwani & Cutler, 2004; Jotwani, Eswaran, Moonga, & Cutler, 2010).

Nuestros resultados contribuyen con información respecto a la función del AgO en el perfil de respuesta de los macrófagos; si bien es la parte más variable de la molécula de LPS y de la que menor información se tenía, podemos decir que la presencia de AgO (W50 y C $\Delta$ PG1051) induce la diferenciación de los macrófagos THP-1 hacia un perfil M1, al igual que la cepa  $\Delta$ PG1051 mutante para el gen de la ligasa, es decir, carente de AgO. Por lo tanto, el AgO no tiene una función específica en relación al perfil de polarización de los macrófagos, ya sea mediante marcadores de superficie, como en los niveles de las citoquinas secretadas correspondientes a cada perfil M1 y M2.

## 8. CONCLUSIONES

- *P. gingivalis* presenta un potencial inmunogénico bajo comparado con *E. coli*.
- La diferenciación de los macrófagos THP-1 hacia un perfil M1, sobre la base de marcadores de superficie y secreción de citoquinas dependería de otros factores de virulencia de *P. gingivalis*, diferentes del AgO.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambarus, C. A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T., Reedquist, K. A., Baeten, D. (2012). Systematic validation of specific phenotypic markers for *in vitro* polarized human macrophages. *Journal of immunological methods*, 375(1-2), 196-206.
- Armitage, G. C. (1995). Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 7(1), 39-53.
- Azad, A. K., Rajaram, M. V., & Schlesinger, L. S. (2014). Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. *Journal of cytology & molecular biology*, 1(1).
- Bäckhed, F., Normark, S., Schweda, E. K., Oscarson, S., & Richter-Dahlfors, A. (2003). Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes and infection*, 5(12), 1057-1063.
- Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B., & Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PloS one*, 8(11), e80908.
- Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2012). *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS microbiology letters*, 333(1), 1-9.
- Brunner, J., Scheres, N., El Idrissi, N. B., Deng, D. M., Laine, M. L., van Winkelhoff, A. J., & Crielaard, W. (2010). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC microbiology*, 10(1), 5.
- Buonavoglia, A., Latronico, F., Pirani, C., Greco, M. F., Corrente, M., & Prati, C. (2013). Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology*, 101(1), 84-88.
- Cavalla, F., Reyes, M., Vernal, R., Álvarez, C., Paredes, R., García-Sesnich, J., Hernández, M. (2013). High Levels of CXC Ligand 12/Stromal Cell-derived

- Factor 1 in Apical Lesions of Endodontic Origin Associated with Mast Cell Infiltration. *Journal of endodontics*, 39(10), 1234-1239.
- Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 147-159): Springer, Cham.
- Chapple, I. L. (2014). Time to take periodontitis seriously. In: British Medical Journal Publishing Group.
- Costa, T. H. R., de Figueiredo Neto, J. A., De Oliveira, A. E. F., e Maia, M. d. F. L., & De Almeida, A. L. (2014). Association between chronic apical periodontitis and coronary artery disease. *Journal of endodontics*, 40(2), 164-167.
- Cotti, E., Dessì, C., Piras, A., Flore, G., Deidda, M., Madeddu, C., Mercurio, G. (2011). Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *Journal of endodontics*, 37(12), 1624-1629.
- Cotti, E., & Mercurio, G. (2015). Apical periodontitis and cardiovascular diseases: previous findings and ongoing research. *International Endodontic Journal*, 48(10), 926-932.
- Davis, B. H., & Zarev, P. V. (2005). Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 63(1), 16-22.
- Davis Jr, M. R., & Goldberg, J. B. (2012). Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(63), e3916.
- Derlindati, E., Dei Cas, A., Montanini, B., Spigoni, V., Curella, V., Aldigeri, R., Bonadonna, R. C. (2015). Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? *PloS one*, 10(3), e0119751.
- Dezerega, A., Madrid, S., Mundi, V., Valenzuela, M. A., Garrido, M., Paredes, R., . Hernández, M. (2012). Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *Journal of inflammation*, 9(1), 8.

- Díaz, L., Hoare, A., Soto, C., Bugueno, I., Silva, N., Dutzan, N., Gamonal, J. (2015). Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe*, 33, 25-32.
- Diya, Z., Lili, C., Shenglai, L., Zhiyuan, G., & Jie, Y. (2008). Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun*, 14(2), 99-107. doi:10.1177/1753425907088244
- Diya Zhang, Lili Chen, Shenglai Li, Zhiyuan Gu, & Jie Yan. (2008). Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun*, 14(2), 99-107.
- Eke, P. I., Thornton-Evans, G., Dye, B., & Genco, R. (2012). Advances in surveillance of periodontitis: the Centers for Disease Control and Prevention periodontal disease surveillance project. *Journal of periodontology*, 83(11), 1337-1342.
- Eugene, C. Y., & Hackett, M. (2000). Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst*, 125(4), 651-656.
- Flad, H.-D., Loppnow, H., Rietschel, E. T., & Ulmer, A. J. (1993). Agonists and antagonists for lipopolysaccharide-induced cytokines. *Immunobiology*, 187(3-5), 303-316.
- Gazivoda, D., Dzopalic, T., Bozic, B., Tatomirovic, Z., Brkic, Z., & Colic, M. (2009). Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of oral pathology & medicine*, 38(7), 605-611.
- Hajishengallis, G., & Sahingur, S. (2014). Novel inflammatory pathways in periodontitis. *Advances in dental research*, 26(1), 23-29.
- Hargreaves, K. M., Goodis, H. E., & Tay, F. R. (2012). *Seltzer and Bender's dental pulp*: Quintessence Chicago.
- Hernandez, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., Gamonal, J. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of dental research*, 90(10), 1164-1170.

- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., León, R. (2008). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of clinical periodontology*, 35(2), 106-113.
- Holden, J. A., Attard, T. J., Laughton, K. M., Mansell, A., O'Brien-Simpson, N. M., & Reynolds, E. C. (2014). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infection and immunity*, 82(10), 4190-4203.
- Hristodorov, D., Mladenov, R., Huhn, M., Barth, S., & Thepen, T. (2012). Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases. *Toxins*, 4(9), 676-694.
- Ip, Y. T., & Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, 10(2), 205-219.
- Jain, S., & Darveau, R. P. (2010). Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology 2000*, 54(1), 53-70.
- Jotwani, R., & Cutler, C. W. (2004). Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells *in vitro* and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infection and immunity*, 72(3), 1725-1732.
- Jotwani, R., Eswaran, S. V., Moonga, S., & Cutler, C. W. (2010). MMP-9/TIMP-1 imbalance induced in human dendritic cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58(3), 314-321.
- Kassebaum, N., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C., & Marcenes, W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of dental research*, 93(11), 1045-1053.
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell death and differentiation*, 13(5), 816.
- Laine, M., & Winkelhoff, A. (1998). Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Molecular Oral Microbiology*, 13(5), 322-325.
- Lam, R. S., O'Brien-Simpson, N. M., Lenzo, J. C., Holden, J. A., Brammar, G. C., Walsh, K. A., Reynolds, E. C. (2014). Macrophage Depletion Abates

*Porphyromonas gingivalis* Induced Alveolar Bone Resorption in Mice. *The Journal of Immunology*, 193(5), 2349-2362.

- López-López, J., Jané-Salas, E., Estrugo-Devesa, A., Castellanos-Cosano, L., Martín-González, J., Velasco-Ortega, E., & Segura-Egea, J. J. (2012). Frequency and distribution of root-filled teeth and apical periodontitis in an adult population of Barcelona, Spain. *International dental journal*, 62(1), 40-46.
- Lu, J., Yang, Z., Jiang, J., Wang, Z., & Zhu, P. (2001). Regulative effect of P38MAPK on release of TNFalpha and NO from alveolar macrophages under endotoxin stimulation. *Chin J Traumatol*, 4(2), 75-77.
- Ma, X., Guo, S., Jiang, K., Wang, X., Yin, N., Yang, Y., Deng, G. (2019). MiR-128 mediates negative regulation in *Staphylococcus aureus* induced inflammation by targeting MyD88. *International immunopharmacology*, 70, 135-146.
- Marolda, C. L., Lahiry, P., Vinés, E., Saldías, S., & Valvano, M. A. (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. In *Glycobiology Protocols* (pp. 237-252): Springer.
- Martin, M., Katz, J., Vogel, S. N., & Michalek, S. M. (2001). Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol*, 167(9), 5278-5285.
- Martinho, F. C., Leite, F. R., Nóbrega, L. M., Endo, M. S., Nascimento, G. G., Darveau, R. P., & Gomes, B. P. (2016). Comparison of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides clinically isolated from root canal infection in the induction of pro-inflammatory cytokines secretion. *Brazilian dental journal*, 27(2), 202-207.
- Matesanz, P., Figuero, E., Giménez, M., Aguilar, L., Llor, C., Prieto, J., & Bascones, A. (2005). Del conocimiento de la etiología bacteriana al tratamiento y la prevención de las infecciones más prevalentes en la comunidad: las infecciones odontogénicas. *Rev Esp Quimioterap*, 18(2), 136-145.
- McNally, A. K., DeFife, K. M., & Anderson, J. M. (1996). Interleukin-4-induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity. *The American journal of pathology*, 149(3), 975.

- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135.
- Meredith, T. C., Mamat, U., Kaczynski, Z., Lindner, B., Holst, O., & Woodard, R. W. (2007). Modification of lipopolysaccharide with colanic acid (M-antigen) repeats in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 7790-7798.
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69(1), 7-17.
- Nishida, E., Hara, Y., Kaneko, T., Ikeda, Y., Ukai, T., & Kato, I. (2001). Bone resorption and local interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Journal of periodontal research*, 36(1), 1-8.
- Ogawa, T., & Uchida, H. (1996). Differential induction of IL-1 $\beta$  and IL-6 production by the nontoxic lipid A from *Porphyromonas gingivalis* in comparison with synthetic *Escherichia coli* lipid A in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 14(1), 1-13.
- Oliveira, R., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, L., Teles, F., Soares, G., & Faveri, M. (2016). Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *Journal of dental research*, 95(6), 711-718.
- Ortiz, M. C., Lefimil, C., Rodas, P. I., Vernal, R., Lopez, M., Acuña-Castillo, C., Escobar, A. (2015). *Neisseria gonorrhoeae* modulates immunity by polarizing human macrophages to a M2 profile. *PloS one*, 10(6), e0130713.
- Paes da Silva Ramos Fernandes, L., Ordinola-Zapata, R., Húngaro Duarte, M., & Alvares Capelozza, A. (2013). Prevalence of apical periodontitis detected in cone beam CT images of a Brazilian subpopulation. *Dentomaxillofacial Radiology*, 42(1), 80179163-80179163.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Graziani, F. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89, S173-S182.
- Paramonov, N. A., Aduse-Opoku, J., Hashim, A., Rangarajan, M., & Curtis, M. A. (2009). Structural analysis of the core region of O-lipopolysaccharide of

- Porphyromonas gingivalis* from mutants defective in O-antigen ligase and O-antigen polymerase. *Journal of bacteriology*, 191(16), 5272-5282.
- Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., & Reynolds, E. C. (2010). Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology 2000*, 52(1), 218-237.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 635-700.
- Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Paramonov, N., Hashim, A., Bostanci, N., Fraser, O. P., Curtis, M. A. (2008). Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2920-2932.
- Rezania, S., Amirmozaffari, N., Tabarraei, B., Jeddi-Tehrani, M., Zarei, O., Alizadeh, R., Zarnani, A. H. (2011). Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 3(1), 3.
- Rodríguez-Alonso, E., & Rodríguez-Monje, M. T. (2009). Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 33(3), 67-79.
- Seol, J.-H., Cho, B.-H., Chung, C.-P., & Bae, K.-S. (2006). Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *Journal of endodontics*, 32(2), 110-114.
- Sima, C., & Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontology 2000*, 63(1), 80-101.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38(1), 135-187.
- Soto, C., Bugueño, I., Hoare, A., Gonzalez, S., Venegas, D., Salinas, D., Quest, A. (2016). The *Porphyromonas gingivalis* O antigen is required for inhibition of apoptosis in gingival epithelial cells following bacterial infection. *Journal of periodontal research*, 51(4), 518-528.
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *The Journal of Immunology*, 175(1), 342-349.

- Sulahian, T. H., Hintz, K. A., Wardwell, K., & Guyre, P. M. (2001). Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *Journal of immunological methods*, 252(1-2), 25-31.
- Valle Rodríguez, J., Gómez-Lus Centelles, M., Prieto Prieto, J., & Liébana Ureña, J. (1995). Composición y ecología de la microbiota oral. *Microbiología oral. Madrid: Interamericana McGraw-Hill*, 402-407.
- Wang, P. L., Azuma, Y., Shinohara, M., & Ohura, K. (2000). Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3), 1161-1167.
- Wang, Q., Zhou, X.-d., Zheng, Q.-h., Wang, Y., Tang, L., & Huang, D.-m. (2010). Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. *Journal of endodontics*, 36(11), 1790-1795.
- Wenzel, I., Roth, J., & Sorg, C. (1996). Identification of a novel surface molecule, RM3/1, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells. *European journal of immunology*, 26(11), 2758-2763.
- Winning, L., Patterson, C. C., Cullen, K. M., Stevenson, K. A., Lundy, F. T., Kee, F., & Linden, G. J. (2015). The association between subgingival periodontal pathogens and systemic inflammation. *Journal of clinical periodontology*, 42(9), 799-806.
- Yu, S., Ding, L., Liang, D., & Luo, L. (2018). *Porphyromonas gingivalis* inhibits M2 activation of macrophages by suppressing  $\alpha$ -ketoglutarate production in mice. *Molecular Oral Microbiology*, 33(5), 388-395.
- Zenobia, C., Hasturk, H., Nguyen, D., Van Dyke, T. E., Kantarci, A., & Darveau, R. P. (2014). *Porphyromonas gingivalis* lipid A phosphatase activity is critical for colonization and increasing the commensal load in the rabbit ligature model. *Infection and immunity*, 82(2), 650-659.
- Zhou, X., Gao, X. P., Fan, J., Liu, Q., Anwar, K. N., Frey, R. S., & Malik, A. B. (2005). LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288(4), L655-662.



## 10. ANEXO

### ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

---

Dr. Eduardo Fernández Pdte./ Sra. P. Navarrete Secr/ Dr. M. Cornejo Vice-Pdte/ Sr. R. La Rosa / Dr. R. Cabello/ Dr. Mauricio Baeza/ Dra. Weronika Weil / Dr. A. Molina

INFORME  
N°:2016/08

1. **Acta de Aprobación de Proyecto FONDECYT titulado “Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica” Versión 04/2016.**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

**Dr. Eduardo Fernández**  
Presidente CEC

**Sra. Paulina Navarrete**  
Secretaria CEC

**Dr. Marco Cornejo**  
Vice Pdte. CEC

**Dr. Mauricio Baeza**  
Miembro permanente CEC

**Sr. Roberto La Rosa**  
Miembro permanente CEC

**Dra. Weronika Weil**  
Miembro permanente CEC

**Dr. Rodrigo Cabello**  
Miembro permanente CEC

**Dr. Alfredo Molina**  
Miembro alterno CEC

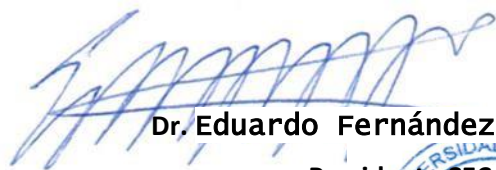
3. **Fecha de Aprobación: 29/06/2016**
4. **Título completo del proyecto: “Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica” Versión 04/2016”.**
5. **Investigador responsable:** Dra. Marcela Hernández Ríos.
6. **Institución Patrocinante:** Facultad de Odontología – Universidad de Chile
7. **Documentación Revisada:**
  - Consentimiento Informado (CI) (Pacientes) aprobado por el CEC, con timbre y fecha de edición correspondiente, debidamente fechado y firmado por todos los involucrados.
  - Certificado del CIB
  - Carta del Director de Departamento
  - Proyecto de Investigación

## 8.- Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos:

- Fueron modificados en cuanto a formato y contenido el Consentimiento y Asentimiento Informado.
- Se agregaron beneficios por participar en el estudio (limpieza dental, y examen dental clínico y radiográfico, exámenes de perfil lipídico, CRP y hemoglobina glicosilada sin costo).
- Se incorpora un flujograma explicativo con los tiempos e intervenciones sobre los participantes en el proyecto.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado “Perfiles de la respuesta de macrófagos inducidos por patógenos endodónticos y su regulación epigenética como determinantes para la inflamación sistémica y la respuesta al tratamiento en la periodontitis apical crónica”



**Dr. Eduardo Fernández G.**  
**Presidente CEC**



**c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.**