

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



El cocultivo de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* aumenta sinérgicamente la expresión de mediadores inflamatorios vía TLR4

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

LUCAS BENJAMÍN YÁÑEZ GUZMÁN

Directora de Tesis: Dra. Denisse Bravo Rodríguez

Santiago-CHILE

Abril 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

LUCAS BENJAMÍN YÁÑEZ GUZMÁN

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Directora de Tesis:

Dra. Denisse Bravo Rodríguez _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez Armijo _____

Dr. Dante Miranda Wilson _____

Dr. Leandro Carreño Márquez _____

Agradecimientos

Han sido largos años de carrera y de postgrado, años donde forjé lazos que perdurarán en el tiempo y que me han acompañado en este arduo camino. A todos los que a continuación nombraré, les agradezco desde el fondo de mi corazón por apoyarme cuando más lo necesité y haberme extendido una mano para lograr la meta.

A **Denisse**, por las enseñanzas y guía no solo a lo largo de mi proceso de tesis, sino que también por los cursos de formación especializada que tomé con ella. En total, llevo 6 años con usted y siempre estuvo dispuesta a guiarme. Gracias por toda la paciencia, el apoyo y las oportunidades que me ha brindado para consolidarme como profesional.

A las personas del Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología: a **Cristopher, Martín, Héctor, Daniela, Jessica, Nía, Carmen, Carla y Victoria**. Gracias por toda la compañía, el cariño, las infaltables risas a carcajadas de cada jornada, las palabras de apoyo cuando era necesario y por hacer ameno el día a día en el laboratorio. Aún así fuese un mal día en términos de experimentos y/o problemas personales, siempre supieron que decir o qué hacer para alejar las nubes grises que se posaban sobre mí. A los chicos del Laboratorio de Biología Periodontal: a **Joaquín, María José, Sebastián, Elizabeth y David**, gracias por esas charlas y/o consejos sobre los resultados, experimentos fallidos o simplemente las conversaciones sobre la vida diaria que me ayudaban a superar los problemas que se presentaban en el camino. A las profesoras del Laboratorio de Bioquímica oral: a la **Dra. Claudia y Dra. Carla** no solo por las enseñanzas y consejos que me brindaban, sino que también por la amabilidad que me mostraron estos 3 años.

A mis queridos amigos y amigas de la universidad: a **María, Francisco, Bruno, Catalina, Felipe y Daniela Martínez**. Gracias por todas esas risas, tardes de estudio, de audios a las 3 de la mañana estudiando para las pruebas o simplemente de tonteras, de los viernes de fiesta, de las juntas de fin de semana, y de las infinidades de recuerdos que creamos juntos. A pesar de que al término de la carrera la vida nos puso en caminos distintos, todos ustedes ocupan un espacio especial en mi corazón. A mis hermanos de otras mamás: a **Matías, Martín, Sofía**. Ustedes fueron las primeras personas con las

que interactúe al entrar a la universidad y congeniamos inmediatamente. Desde ese día, comenzamos una maravillosa y duradera amistad que nos acompaña hasta el día de hoy, en la cual hemos compartido momentos que siempre recordaré como nuestros viajes, tardes o noches de estudio, las discusiones y peleas al hacer trabajos en conjunto, nuestras juntas, conversaciones, etc. Tengo la total certeza qué, cuando todos terminemos la etapa universitaria, seguiremos nuestra amistad y luego, nos reiremos de estas aventuras con el pasar de los años.

A mis amigos: a **Tomás, Martín y Cristóbal**. Largos años de amistad desde que un juego en común nos puso en contacto, un recreo en el colegio. Gracias por nuestras juntas, las risas, los juegos de noche, los retos que me ganaba a las 3 am de la mañana por reírme muy fuerte y todas las conversas, hayan sido de temas serios o triviales, todo me animó y me mantuvo alegre tras extenuantes jornadas y sé qué, serán muchos más los momentos que compartiremos. Además, agradecer a **Eduardo, Clemente y Diego**, por sumarse a mi vida y por esta amistad que hemos forjado, por las risas de hoy y de mañana. Gracias a todos. Asimismo, agradecer a mis amigos del colegio: a **Lucas, Matías, Pedro Pablo, Guido, Esteban, Miguel**, si bien nos hemos distanciado un poco este último tiempo, agradezco a la vida por cruzar nuestros caminos y, además, por todo lo que hemos compartido y compartiremos en un futuro.

A mi querida familia: **Alexis, María Elena, Aníbal, Javiera y José Joaquín**. Ustedes saben todo lo que los amo y que les estoy eternamente agradecido por el incondicional cariño y apoyo que me brindan en el día a día, por escucharme y aguantarme en mi estrés, por los abrazos cuando sentía que el mundo se me venía encima, por nunca dejarme solo y guiarme aun así no entendiesen en qué estaba trabajando. No saben lo afortunado que me considero de que sean mi familia.

Por último, pero por supuesto que no menos importante, agradecerte a ti, **Carolina**. No sabes lo importante que eres para mí y el rol que has jugado no solo en mis estudios y trabajo, sino que en mi vida. Tú estuviste ahí para mí en mis días más grises, cuando la ansiedad me comía, cuando solo quería rendirme, tú me escuchabas, me prestabas un hombro y con tu sonrisa, me ayudabas a ponerme de pie y seguir caminando a la meta. Te agradezco cada abrazo, cada sonrisa, cada momento que compartimos y, sobre todo,

agradezco a la vida por cruzar a una persona tan maravillosa como tú en mi camino. Sé y confío en que todos nuestros planes se volverán realidad porque somos un equipo, y juntos podemos con todo. Así, podría hablar de ti por páginas y páginas, pero ya que no hay suficientes palabras para explicar cómo me siento por ti y lo agradecido que estoy, lo resumiré en pocas: te amo, hoy, mañana y siempre.

Les estaré eternamente agradecido.

Presentaciones a congresos nacionales:

- **Yáñez, Lucas.**, Soto, Christopher., Salinas, Daniela & Bravo, Denisse. Coculture of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* and its effects in gingival epithelial cells proliferation. XLIII Congreso Chileno de Microbiología. 30 de noviembre-02 de diciembre del 2021, Formato digital, Santiago, Chile.
- **Yáñez, Lucas.**, Tapia, Héctor., Pacheco, Martín., Soto, Christopher., Salinas, Daniela., Díaz, Jessica & Bravo, Denisse. The coculture of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* increases the expression of pro-inflammatory cytokines through TLR4 signaling. XLIV Congreso Chileno de Microbiología. 29 de noviembre-02 de diciembre del 2022, La Serena, Chile.
- **Yáñez, Lucas.**, Tapia, Héctor., Pacheco, Martín., Soto, Christopher., Salinas, Daniela., Díaz, Jessica & Bravo, Denisse. The coculture of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* increases the expression of pro-inflammatory cytokines through TLR4 signaling. Summer course in inflammation. 19 de enero al 20 de enero del 2023, Talca, Chile. Ganador al mejor póster categoría magíster.

Publicaciones:

- **Yáñez et al., 2023.** The coculture of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* increases the expression of pro-inflammatory cytokines through TLR4 signaling. **En preparación.**

Índice general

Índice general	5
Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Abreviaturas	12
Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	16
1.1 Características generales de la periodontitis.....	16
1.2 Modelo de sinergia polimicrobiana y disbiosis (PSD).....	18
1.3 Características generales del cáncer.....	20
1.3.1 Cáncer oral.....	20
1.3.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> : vínculo con tumorogénesis.....	21
1.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i> : aspectos generales.....	23
1.4.1 Factores de virulencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	23
1.5 <i>Fusobacterium nucleatum</i> : aspectos generales.....	25
1.5.1 Factores de virulencia de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	27
1.6 Interacción entre <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> y su efecto en periodontitis y tumorogénesis oral.....	29
1.7 Citoquinas proinflamatorias y su relación con la destrucción periodontal y tumorogénesis oral.....	32
2. Hipótesis	35
3. Objetivos	35
3.1 Objetivo general	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. Materiales y métodos	36
4.1 Instrumentos y equipos.....	36
4.2 Materiales y reactivos.....	37
4.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	37

4.3.1 Condiciones de cocultivo bacteriano.....	38
4.3.2 Curvas de crecimiento de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	38
4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	39
4.5 Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias del cocultivo.....	39
4.6 Línea de cultivo celular y condiciones de cultivo.....	40
4.6.1 <i>Knockdown</i> del receptor TLR4.....	40
4.7 Protocolo de infección celular con <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> y el cocultivo de ambas.....	41
4.8 Ensayo de viabilidad celular MTS.....	43
4.9 Ensayo de Western blot.....	43
4.10 Reacción de polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	44
4.11 Ensayo de azul tripán para viabilidad celular.....	46
4.12 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	46
4.13 Ensayo de migración.....	47
4.14 Análisis estadístico.....	47
5. Resultados.....	48
5.1 Determinación del efecto del cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en células OKF6/TERT2.....	48
5.2 Evaluación de la activación de la vía NF- κ B en células OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	55
5.3 Determinación del efecto sobre la viabilidad celular de cultivos OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	58
5.4 Determinación de la contribución del receptor TLR4 en la expresión de citoquinas proinflamatorias, activación de la vía de NF- κ B y en la viabilidad celular de células OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	60
6. Discusión.....	73
7. Conclusión.....	86
8. Glosario.....	87
9. Material suplementario.....	90
10. Bibliografía.....	101

Índice de tablas

Tabla 1: Lista de las secuencias de partidores <i>forward</i> y <i>reverse</i> utilizados para cada gen de interés.....	45
Tabla 2: Tamaños teóricos de los amplicones de los genes de interés.....	93
Tabla 3. Lista de la eficiencia de los partidores utilizados para las reacciones de qPCR.....	94
Tabla 4. Lista de las cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas y la concentración obtenida de los plásmidos shTLR2 purificados.....	96

Índice de Figuras

Figura 1: Estado de salud versus periodontitis.....	16
Figura 2: Modelo de sinergia polimicrobiana y disbiosis.....	19
Figura 3: El rol de <i>Fusobacterium nucleatum</i> en la biopelícula oral.....	26
Figura 4. Diferencia experimental entre el cocultivo y la coinfección de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	42
Figura 5. Curvas de crecimiento para monocultivos y conteo de las UFC/mL obtenidas al cocultivar <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> por 24 h.....	49
Figura 6. Microscopías electrónicas de transmisión de monocultivos y el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	52
Figura 7. Efectos del cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> sobre la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8.....	54
Figura 8. Análisis de los niveles de NF-kB tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	56
Figura 9. Efectos del cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> sobre los niveles de pNF-kB.....	57
Figura 10. Evaluación de la viabilidad células tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	59
Figura 11. Resultados preliminares de los ensayos de azul de tripán.....	60
Figura 12. Niveles y distribución celular del receptor TLR4 tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	63
Figura 13. Niveles de TLR4 y p65 tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> en cultivos celulares shTLR4.....	65

Figura 14. Viabilidad celular de cultivos shTLR4 tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	67
Figura 15. Resultados preliminares del ensayo MTS de viabilidad celular de cultivos shScramble	68
Figura 16. Efectos del <i>knockdown</i> de TLR4 sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias tras la infección con el cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i>	71
Figura 17. Resultados preliminares del qPCR de células shScramble.....	72
Figura 18. Efectos del cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> sobre la migración de GECs.....	81
Figura 19. Modelo propuesto sobre el efecto del cocultivo de <i>P. gingivalis</i> y <i>F. nucleatum</i> en la expresión de citoquinas proinflamatorias de GECs.....	85
Figura S1. Estandarización del <i>knockdown</i> del receptor TLR4.....	90
Figura S2. Efectos de la infección a distintas MOIs con monocultivos de <i>F. nucleatum</i> sobre la viabilidad celular de cultivos OKF6/TERT2.....	91
Figura S3. Amplicones obtenidos de los partidores de interés tras la gradiente de temperatura.....	92
Figura S4. Curva de calibración para las citoquinas proinflamatorias y gen <i>housekeeping</i>	94
Figura S5. Electroforesis en gel de agarosa de los plasmidios codificantes para la secuencia shTLR2.....	95
Figura S6. Resultados preliminares de inmunofluorescencia de TLR2.....	97
Figura S7. Estandarización Western blot contra TLR2.....	98

Figura S8. Estructura del plasmidio utilizado en el proceso de *knockdown* de TLR4.....100

Abreviaturas

ANOVA: Análisis de Varianza

BHI: Infusión de Cerebro-Corazón

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DO₆₀₀: Densidad Óptica evaluada a 600 nanómetros

EDTA: Ácido Etildiaminotetraacético

GECs: Células Epiteliales Gingivales

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

IL-1 β : Interleuquina 1 Beta

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

KSFM: Medio de Crecimiento para Queratinocitos Libre de Suero

LPS: Lipopolisacárido

MOI: Multiplicidad de Infección

mRNA: Ácido Ribonucleico Mensajero

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

NF- κ B: Factor Nuclear Kappa B

OAg: Antígeno O

PBS: Tampón Fosfato Salino

PSD: Modelo de Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis

qPCR: Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa

RPM: Revoluciones Por Minuto

SDS: Dodecilsulfato De Sodio

shRNA: ARN de Horquilla Pequeña

shTLR4: Células que sufrieron un *knockdown* contra TLR4

shSCR: Células que sufrieron una transducción con una secuencia aleatoria

STAT-3: Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3

TEMED: Trimetiletilendiamina

TBS: Tampón Tris-Salino

TLR: Receptor de Tipo *Toll*

TNF- α : Factor Necrótico Tumoral Alfa

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Resumen

La periodontitis es una enfermedad polimicrobiana de carácter disbiótico altamente prevalente a nivel mundial. Hoy en día es aceptado que el proceso disbiótico generado es el motor que promueve el progreso de la periodontitis. En este contexto, se propone a *P. gingivalis* como uno de los patógenos angulares que inician este proceso y, además, a *F. nucleatum* como un contribuyente del mismo. Adicionalmente, se ha reportado que ambas bacterias estarían vinculadas a procesos tumorigénicos orales debido a la activación de NF- κ B y a la promoción de la expresión de ciertas citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, mediado por la activación del receptor TLR4. Estas citoquinas también contribuyen a la progresión de la periodontitis a través de un proceso de inflamación crónica. Debido a que se ha reportado sinergia en un contexto de periodontitis al coinfectar con estos microorganismos y, además, de que se ha evidenciado que el cocultivo de estas bacterias afecta la virulencia de ambas, se propone la siguiente hipótesis: **“La infección con el cocultivo de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* aumenta de manera sinérgica la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y la viabilidad celular en cultivos celulares línea OKF6/TERT2 mediante la vía TLR4/NF- κ B”**.

En virtud de lo anterior, se generó -por primera vez- un modelo de cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* y posterior infección de células epiteliales gingivales (OKF6/TERT2). Como resultado se obtuvo que, tras cocultivar *P. gingivalis* y *F. nucleatum* por 24 h y en anaerobiosis, ambas bacterias estarán a una razón similar. Además, se comprobó que estos microorganismos interactúan físicamente al ser cocultivados en estas condiciones. Por otro lado, al infectar células OKF6/TERT2 se determinó un incremento en la expresión de TNF- α e IL-1 β , y un aumento sinérgico en la expresión de IL-6 e IL-8. En este contexto, se reportó un incremento en la producción de NF- κ B al estimular con la coinfección. Asimismo, se observó que el cocultivo aumenta la migración de células OKF6/TERT2. Finalmente, se realizó un silenciamiento de TLR4 para evaluar su posible rol en los cambios reportados anteriormente y se determinó que este contribuye sólo a la expresión génica de IL-1 β e IL-6.

Abstract

The coculture of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* increases synergistically the expression of proinflammatory mediators through TLR4.

Periodontitis is a polymicrobial and dysbiotic disease highly prevalent worldwide. Nowadays it is accepted that the dysbiotic process generated is the driving force promoting the progression of periodontitis. In this context, *P. gingivalis* is proposed as a keystone pathogen that promotes this process and, furthermore, *F. nucleatum* contributes to it. Moreover, it has been reported that both bacteria are linked to oral tumorigenic onset and progression due to the activation of NF- κ B and the promotion of the expression of certain pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, mediated by the activation of TLR4 receptor. Then, these cytokines also contribute to periodontitis progression through a chronic inflammation process. Owing to the fact that there are several studies reporting synergy when coinfecting with these microorganism in a context of periodontitis and, moreover, that it has been evidenced that the coculture of these bacteria affects the virulence of both of them, we propose the following hypothesis: **“The infection with the coculture of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* synergistically increases the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 and cell viability in OKF6/TERT2 cell cultures through TLR4/NF- κ B”.**

Hence, we proceeded to elaborate -for the very first time- a model of coculture of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* and subsequent infection of gingival epithelial cells (OKF6/TERT2). As results we obtained that, after coculturing *P. gingivalis* and *F. nucleatum* for 24 h in anaerobiosis, both were at a similar ratio. Moreover, we proved that these microorganisms interact physically when cocultured in these conditions. On the other hand, after infecting OKF6/TERT2 cells we determined an increment in TNF- α and IL-1 β expression, and a synergic increase in IL-6 and IL-8 expression. In this context, we reported an increase in NF- κ B production after coinfection with *P. gingivalis* and *F. nucleatum*. Likewise, we observed that the coculture increases OKF6/TERT2 cells migration. Finally, we performed a *knockdown* of TLR4 to evaluate its possible role in the

changes previously reported and we determined that this receptor contribute only to the genetic expression of IL-1 β and IL-6.

1. Introducción

1.1 Características generales de la periodontitis

Las enfermedades periodontales se definen como condiciones disbióticas que afectan el margen subgingival, y se caracterizan por un desbalance entre la comunidad microbiana subgingival y la respuesta inmune del hospedero [1]. Dentro de esta clasificación se encuentra la periodontitis, la cual es una patología caracterizada por una inflamación crónica del periodonto producto de la disbiosis del margen subgingival, culminando en la destrucción del tejido de soporte del diente, resorción del hueso alveolar y la pérdida de la pieza dental [2] (**Figura 1**).

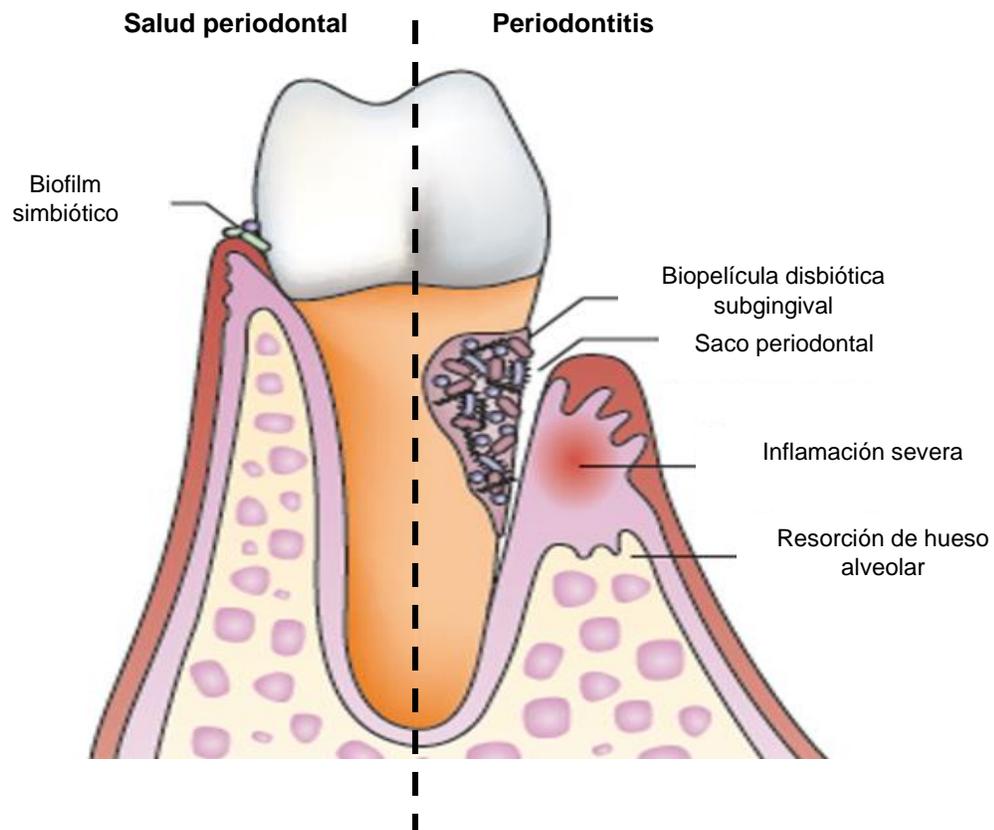


Figura 1: Estado de salud versus periodontitis. Se logra apreciar un individuo en estado de salud periodontal (lado izquierdo) en comparación a un sujeto en estado de periodontitis (lado derecho). En el lado de periodontitis se observa la biopelícula bacteriana de carácter disbiótica y la destrucción de los tejidos de soporte del diente, producto de la inflamación en respuesta a dicha biopelícula. Modificado de Hajishengallis, 2015 [10].

Recientemente se ha demostrado que la periodontitis sería la sexta condición más prevalente a nivel mundial, afectando -en su estadio más severo- al 10% de la población adulta [3]. Sin embargo, la prevalencia de esta patología varía acorde a las regiones geográficas afectadas, siendo la latinoamericana y las subsaharianas del este de África aquellas con mayor prevalencia, llegando a un 20% aproximadamente [4]. Chile no queda exento, es más, alrededor del 90% de la población adulta presenta uno o más signos clínicos de esta patología [5].

Esta enfermedad presenta diversos factores etiológicos dentro de los cuales se encuentra la mala higiene oral, estatus socioeconómico, edad y etnia [6]. Dentro de estos factores etiológicos destacan el consumo de tabaco y enfermedades sistémicas como diabetes mellitus, además de la susceptibilidad genética del paciente, es decir, sujetos que presenten anormalidades inmunológicas que impidan el correcto funcionamiento y reclutamiento de células inmunes al sitio afectado, como por ejemplo el síndrome de Cohen [7].

Durante estos últimos años se ha establecido que la periodontitis se correlacionaría directamente con enfermedades sistémicas debido a la inflamación crónica generada durante la enfermedad. Por ejemplo, se ha reportado que esta patología aumentaría el riesgo de sufrir enfermedades sistémicas tales como la diabetes, artritis reumatoide, obesidad, osteoporosis, complicaciones durante el embarazo y cáncer [8, 10]. Además, se ha logrado detectar la presencia de ciertos patógenos periodontales (como *Porphyromonas gingivalis*) en lesiones ateromatosas mediante estudios de trazas de DNA, RNA o antígenos derivados de dichos microorganismos [9].

Desde tiempos del hombre primitivo, la periodontitis se ha vuelto prevalente tras la domesticación de las plantas y animales en las sociedades neolíticas (hace 10.000 años atrás aproximadamente), cuando la microbiota oral sufrió un cambio composicional que se tradujo en un aumento de especies como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) y otras asociadas a periodontitis [10]. *P. gingivalis* se ha propuesto como un patógeno que juega un rol de piedra angular o “*keystone pathogen*” en la ecología oral debido que -a pesar de estar en baja abundancia relativa- es capaz de alterar la comunidad bacteriana, afectando la homeostasis del hospedero y promoviendo así la patogénesis de la enfermedad [11]. Estos “*keystones pathogens*” pueden contribuir al inicio de la

periodontitis al afectar el correcto funcionamiento del sistema inmune del hospedero, sin embargo, es la microbiota disbiótica y sus diversas interacciones interbacteriales sinérgicas las que –en conjunto- promueven la respuesta inflamatoria por parte del hospedero, culminando así en la destrucción del tejido periodontal [12].

1.2 Modelo de Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis (PSD)

La patogénesis de la periodontitis puede ser explicada mediante el Modelo de Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis (PSD). Este modelo comprende la participación de bacterias tanto Gram negativo como Gram positivo en la etiología de la enfermedad, siempre y cuando puedan promover o tolerar el ambiente inflamatorio [13]. La comunidad microbiana asociada a periodontitis interactúa de manera sinérgica para colonizar de manera exitosa el margen subgingival, lograr una óptima adquisición de nutrientes y lograr persistir en el ambiente inflamatorio característico de esta patología [14].

Se ha demostrado que *P. gingivalis* promueve cambios en la abundancia, composición y virulencia de la microbiota oral, sin embargo, en estudios de ratones libres de gérmenes (libres de bacterias comensales), la colonización de este microorganismo por sí solo no fue capaz de gatillar periodontitis [11]. A pesar de que es necesaria la virulencia de los *keystone pathogens* para la génesis de la periodontitis, estos por sí solos no son capaces de gatillar la enfermedad, por lo que su virulencia adquiere relevancia sólo en un contexto de una comunidad microbiana sinérgica [13].

Acorde al modelo descrito por Lamont y Hajishengallis, 2015 (**Figura 2**), las bacterias colonizantes del margen subgingival se establecen en una comunidad fisiológicamente compatible [15]. El sobrecrecimiento y la patogenicidad de esta comunidad es limitado por la respuesta inflamatoria del hospedero, generando así un estado inmunoinflamatorio controlado, lo cual es característico del tejido oral sano. Sin embargo, la suma de la susceptibilidad del paciente más la colonización del margen subgingival por los llamados *keystone pathogens*, inicia la transición de una comunidad microbiana normal a una de carácter disbiótico y patogénico [15]. La destrucción de los tejidos periodontales es una consecuencia de la sinergia entre los componentes bacterianos de la comunidad disbiótica y las perturbaciones ambientales causadas por la desregulación de la respuesta inmune del hospedero y la inflamación producida [12].

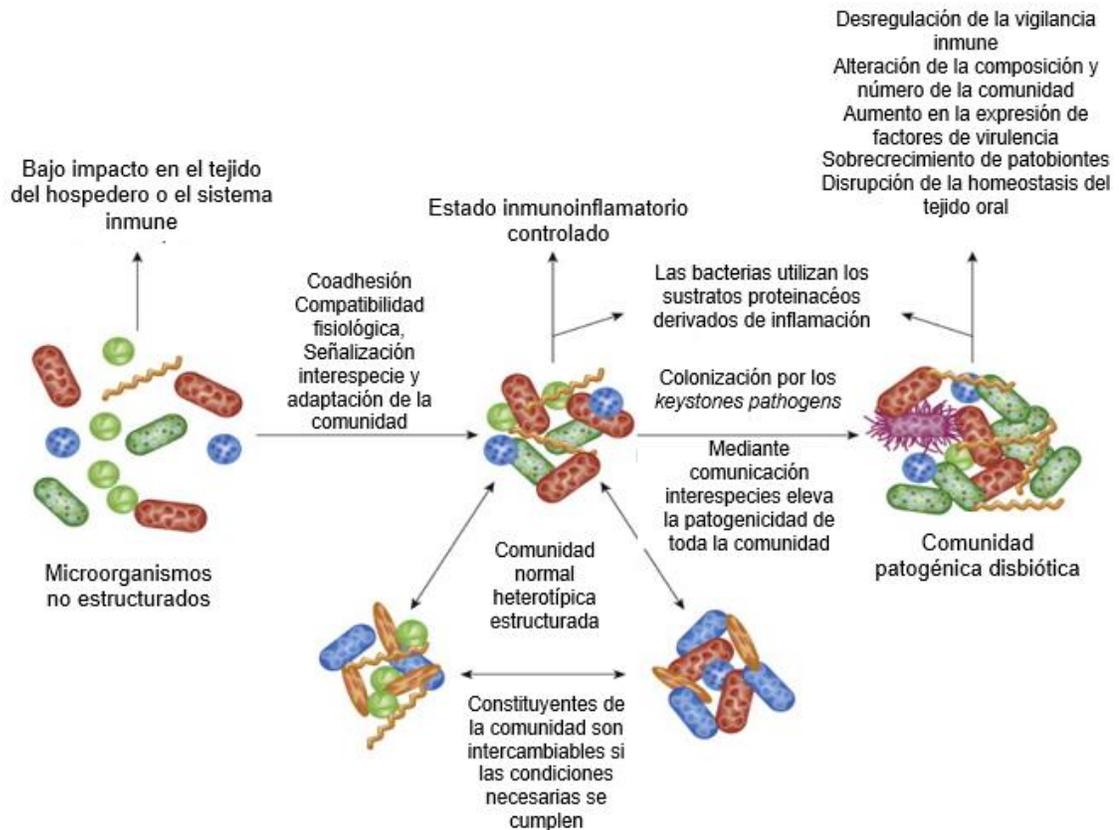


Figura 2: Modelo de Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis. Se logra apreciar que el margen subgingival es colonizado -en primera instancia- por una serie de microorganismos no estructurados, los cuales se logran establecer en una comunidad heterotípica estructurada que se encuentra en equilibrio con el sistema inmune del hospedero. A pesar de que los microorganismos que componen dicha comunidad pueden producir toxinas o causar inflamación por sí solos, estos son delimitados en cuanto a número y virulencia por el sistema inmune. Sin embargo, la colonización por parte de los *keystone pathogens* como *P. gingivalis* y el aumento en su número relativo por las interacciones sinérgicas interespecies con los demás miembros de la comunidad microbiana, tiene como consecuencia la alteración de la composición y el aumento en la virulencia y número de toda la comunidad, remodelándola así desde una de carácter normal a una disbiótica y patogénica, culminando en la destrucción del tejido periodontal. Modificado de Lamont y Hajishengallis, 2015 [15].

A lo largo de los últimos 100 años, se ha ido estableciendo una correlación entre la inflamación crónica y el cáncer. En 1986 se demostró que la inflamación (o reparación

de tejidos) y la carcinogénesis tienen en común características como el aumento en la angiogénesis, en la proliferación y migración celular [16]. Actualmente, se estima que alrededor del 25% de los cánceres están asociados a inflamación crónica debido a infecciones (como hepatitis o gastritis crónica) u otros orígenes como el uso de agentes fisicoquímicos [17]. Es más, está estipulado que la infección por *Helicobacter pylori* aumenta el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en un 75% debido a la respuesta inflamatoria y mecanismos moleculares que esta bacteria activa [18].

1.3 Características generales del cáncer

El cáncer es la mayor carga económica, social y clínica en términos de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs) de todas las enfermedades humanas y es la segunda causa de muerte a nivel global [19].

Al exponer las células de un tejido a la infección por un microorganismo o un agente irritante químico como fenoles o radiación UV, se reclutan células inmunes inflamatorias al sitio afectado y se induce la proliferación celular y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (NOS), lo que genera daño oxidativo del DNA y reduce su capacidad de reparación. En tejidos crónicamente inflamados se produce la subversión de la muerte celular y/o de los procesos de reparación, resultando en la replicación del DNA y proliferación de células que han perdido el control normal de su crecimiento [20]. Así, el proceso de desarrollo de cáncer se inicia cuando la secuencia de DNA de una célula sufre mutaciones genéticas y se produce la inestabilidad del genoma debido a fallos en el proceso de reparación del DNA [17].

1.3.1 Cáncer oral

Dentro de los distintos tipos de cáncer se destaca el cáncer oral, siendo este la sexta malignidad más común a nivel global [21]. Este representa un problema de salud mundial debido a su morbilidad y mortalidad, sin embargo, dichas tasas pueden variar entre los diferentes países, grupos etarios, razas y géneros, siendo más común en hombres. Acorde a datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) -en el año 2012- se reportaron 145.353 muertes por cáncer oral a nivel global, representando el 1,9% de todas las muertes por cáncer en ese año [22]. El carcinoma oral de células escamosas (OSCC) es el que posee mayor tasa de mortalidad dentro de los cánceres

orales. Acorde a los datos publicados en el 2018 por el observatorio global del cáncer (GLOBOCAN), se diagnosticaron 350.000 nuevos casos y más de 175.000 muertes a nivel mundial [23]. Respecto a la epidemiología de esta enfermedad en Chile, se estima que representa el 1,6% del total de los cánceres y, además, se ha observado que la supervivencia de los pacientes ha ido disminuyendo en los últimos años, evidenciando la falta de políticas públicas orientadas al diagnóstico temprano [24].

Dentro de sus factores de riesgo se encuentran la exposición a sustancias químicas, pesticidas y metales pesados que inducen alteraciones genéticas pro oncogénicas y epigenéticas, además de otros factores como lo son las lesiones orales, enfermedades inflamatorias, infecciones y la disbiosis bacteriana, siendo esta última de gran importancia para el desarrollo de cáncer oral [25]. Asimismo, se ha demostrado que el desarrollo de OSCC se ve estrechamente influenciado los hábitos de vida del hospedero como lo son el consumo de tabaco, el abuso de alcohol, mala higiene oral e infecciones virales [25].

Entre todos los tipos de cáncer, el oral está particularmente relacionado con la composición de la microbiota oral e intestinal [25]. Se ha determinado que la microbiota salival de pacientes sanos es distinta a la de aquellos con lesiones premalignas y OSCC, reportándose un enriquecimiento de ciertos filos bacterianos como *Fusobacterium* y *Bacteroidetes*, donde se encuentran géneros como *Fusobacterium* y *Porphyromonas* [26]. Al analizar las especies bacterianas asociadas con OSCC, se destacan principalmente *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) y *P. gingivalis* como unas de las bacterias más representativas de esta relación [25].

1.3.2 *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*: vínculo con tumorogénesis

En estudios de análisis de tejido tumoral oral, se determinó un aumento en el número de unidades formadoras de colonias (CFU) de *P. gingivalis* y de *F. nucleatum* en la biopelícula de muestras clínicas provenientes de tumores de pacientes con OSCC en comparación a muestras de mucosa sana proveniente de pacientes periodontalmente sanos [27]. Respecto a *P. gingivalis*, se ha determinado que está presente en mayor cantidad en tejidos de individuos afectados por OSCC respecto a muestras sanas y que,

además, invade tejidos afectados por esta malignidad [28]. Asimismo, este microorganismo invade, sobrevive y se disemina célula-célula en las células epiteliales gingivales (GECs) no transformadas del hospedero [29]. Una vez en el interior de las GECs, *P. gingivalis* inhibe el proceso de apoptosis y muerte programada, que corresponde a un mecanismo de sobrevida que utilizan las células afectadas por procesos malignos, mediante la activación de ciertas vías de señalización como la JAK/STAT3 y la inhibición de la caspasa-3 efectora [30]. En este contexto de cáncer, se ha descubierto que la infección por *P. gingivalis* en GECs modula la expresión y actividad (en términos de activación o inhibición) de proteínas relacionadas al control del ciclo celular tales como ciclinas, la proteína supresora de tumores p53 y PI3K, de tal manera de promover la proliferación de estas células [31]. Adicionalmente, se ha reportado que la infección de diversos tipos celulares con *P. gingivalis* genera la activación del factor de transcripción NF- κ B [32], suceso que es considerado como un evento clave en la respuesta inflamatoria y común en procesos carcinogénicos debido a que esta proteína está relacionada con procesos como la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis y la promoción de la proliferación celular, los cuales son conocidos marcadores (o *Hallmarks*) del cáncer [33].

Por otro lado, *F. nucleatum* también se ha considerado como un microorganismo relacionado a procesos inflamatorios y malignos. Mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), se determinó que *F. nucleatum* está aumentada en términos de abundancia en lesiones cancerosas de pacientes con OSCC [34]. En estudios de modelos murinos de tumor oral, se ha evidenciado que la infección con esta bacteria es capaz de activar la vía de señalización del transductor de señales y activador de la transcripción-3 (STAT-3), molécula clave en la progresión del cáncer debido a que regula la expresión de genes responsables de la supresión de la apoptosis, el aumento la proliferación celular, la angiogénesis, la metástasis e invasión [35]. Además, *F. nucleatum* gatilla una fuerte respuesta inflamatoria mediante la activación del receptor *Toll-like receptor 4* (TLR4) y la subsecuente translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, promoviendo así la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6), IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [36].

Todos los efectos celulares que conlleva la infección por *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son parte de los llamados *Hallmarks* de cáncer, por ende, se puede establecer una correlación entre la infección por *F. nucleatum* y *P. gingivalis* con el desarrollo y progresión de cáncer oral.

1.4 *Porphyromonas gingivalis*: aspectos generales

P. gingivalis es una bacteria Gram negativo, anaerobia, no mótil y asacrolítica que se encuentra en la biopelícula subgingival oral y que infecta y sobrevive en GECs, además de que se disemina célula-célula sin transitar el espacio extracelular [37, 38]. Este microorganismo es de suma importancia en nuestro país puesto que se ha determinado que es uno periodontopatógenos más prevalentes en pacientes afectados por periodontitis en la población chilena [39].

Esta bacteria – en un contexto de periodontitis- se considera un *keystone pathogen*, y su persistencia crónica en el periodonto depende específicamente de su habilidad para infectar el tejido epitelial oral y evadir la respuesta inmune del hospedero para lo cual despliega sus diversos factores de virulencia [40]. Dentro de estos factores destacan el lipopolisacárido (LPS), la cápsula que causa la desregulación del ciclo celular; cisteína proteasas (también llamadas gingipainas) que destruyen la matriz extracelular; y las fimbrias, las cuales permiten la unión de la bacteria a la superficie celular [41].

1.4.1 Factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*

Las células inmunes y epiteliales del hospedero expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, en inglés) que son capaces de sensar los diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, en inglés), entre los cuales se encuentran lípidos, lipopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos [42]. Una vez reconocido su ligando (PAMPs), comienza una cascada de señalización celular que culmina en una respuesta inflamatoria tras la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual promueve la transcripción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [43]. El LPS de *P. gingivalis* es efectivamente reconocido por los receptores TLR2 y TLR4, gatillado una respuesta inflamatoria vía la activación de NF- κ B [43,44]. Sin embargo, dicho factor de virulencia de esta bacteria posee una inmunogenicidad

relativamente baja en comparación con otras bacterias Gram negativo, lo que contribuye a que la infección sea de carácter crónico [45].

El LPS es un glicolípido complejo compuesto de tres dominios unidos de manera covalente entre ellos: el lípido A o endotoxina, el cual está anclado a la membrana externa bacteriana; el oligosacárido *core* o central y el antígeno O (OAg), la cual es la región más externa y variable de este factor de virulencia [46]. En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se determinó que la inhibición de la apoptosis y el aumento en la viabilidad que produce la infección por *P. gingivalis* en GECs se debe a la presencia del OAg en el LPS y, además, la misma presencia de este antígeno aumenta los niveles de mRNA de TLR4, lo cual se correlaciona con el efecto anti apoptótico que produce esta bacteria [47].

Por otro lado, las gingipaínas son un factor de virulencia importante para *P. gingivalis*. Estas proteínas son parte de la familia de las enzimas cisteína proteasas y se encuentran en la membrana exterior, en vesículas de membranas externas (OMVs) y en estructuras extracelulares de *P. gingivalis*. Las gingipaínas tienen como función degradar un gran número de proteínas del hospedero como proteínas inmunomoduladores, de vías de señalización celular, proteínas regulatorias y moléculas de adhesión [48]. Por ejemplo, a modo de evasión de la actividad del sistema inmune del hospedero, las gingipaínas de *P. gingivalis* pueden afectar la cascada del complemento del sistema inmune al degradar la proteína C3 del complemento, evitando así su opsonización y su subsiguiente degradación [49]. Además, las gingipaínas degradan ciertas proteínas de la superficie celular del hospedero como las cadherinas, integrinas y las moléculas de adhesión celular (CAMs), lo cual tiene como consecuencia la destrucción del epitelio gingival, la formación del saco periodontal, la invasión de la bacteria y difusión de sus toxinas hacia los tejidos periodontales internos [50].

Por último, se destacan las fimbrias de *P. gingivalis* como uno de sus principales factores de virulencia. Estas son estructuras filamentosas localizadas en la superficie del microorganismo y promueven la adhesión bacteriana a distintas superficies como la matriz extracelular, la célula a infectar y a otras bacterias, participando así en la formación de la biopelícula oral [48]. Se ha reportado que la fimbria FimA causa un

incremento en la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 en células mononucleares de sangre periférica humana vía la activación del receptor TLR4 y del factor de transcripción NF-kB [51]. Además, se ha observado que este factor de virulencia aumenta los niveles de IL-8 en GECs vía la activación del receptor TLR2 [52].

Las interacciones microbianas que se dan en la biopelícula subgingival son de suma importancia en la etiología de la periodontitis. En este contexto, se ha descrito que *P. gingivalis* es una de las más de 700 especies bacterianas que se encuentran en la cavidad oral y que, adicionalmente, se encuentran en equilibrio con la respuesta inmune del hospedero [48]. Se ha descrito que esta bacteria es capaz de interactuar de manera sinérgica con ciertos patógenos orales como *Treponema Denticola* (*T. denticola*) [90] y *F. nucleatum*. Las interacciones entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* que toman lugar en la cavidad oral son posibles principalmente gracias al uso de sus fimbrias y adhesinas, es más, se reporta que son aisladas en conjunto frecuentemente desde pacientes con enfermedades orales de carácter inflamatorias crónicas, como la periodontitis [53]. Por lo tanto, la interacción entre estos dos últimos microorganismos podría ser clave en esta patología.

1.5 *Fusobacterium nucleatum*: aspectos generales

Fusobacterium nucleatum es un bacilo Gram negativo, anaerobio, caracterizado por ser de las especies más abundantes de la cavidad oral, además de estar relacionado a enfermedades extraorales como el cáncer colorrectal [54]. Dentro de la biopelícula subgingival, *F. nucleatum* se ubica en la capa intermedia, lo que le permite cumplir un rol de “puente” entre las especies que componen dicha biopelícula, interactuando simultáneamente con uno o más microorganismos [55]. Más específicamente, este papel estructural que cumple *F. nucleatum* en la biopelícula subgingival (**Figura 3**) permite conectar los llamados colonizadores primarios del margen subgingival -como especies *Streptococcus*- con los colonizadores secundarios, como *P. gingivalis*, siendo clave la morfología de bacilo que posee *F. nucleatum* para facilitar sus múltiples interacciones simultáneas [54].

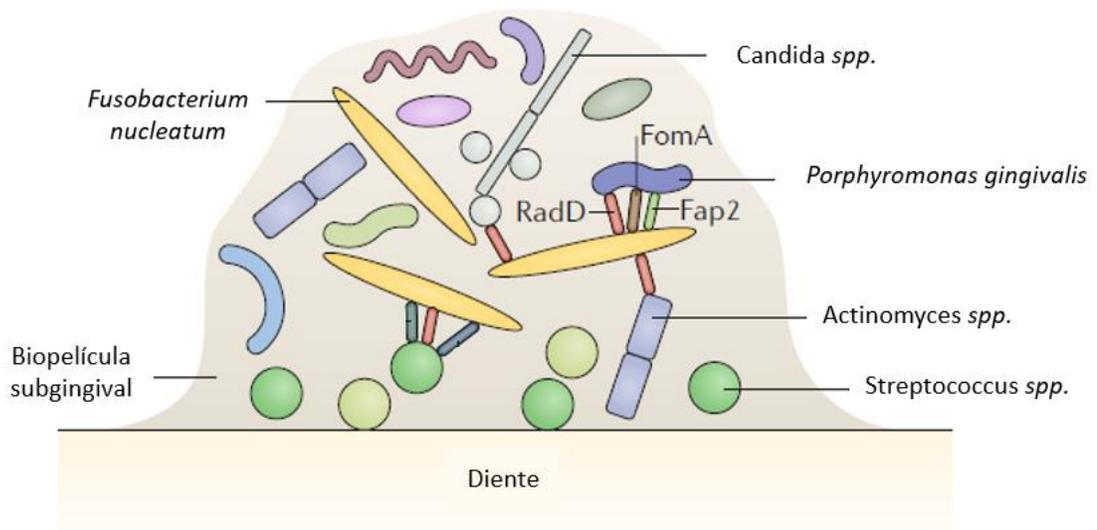


Figura 3: El rol de *Fusobacterium nucleatum* en la biopelícula oral. Se observa que *F. nucleatum* cumple un rol de organismo puente entre los microorganismos que se adhieren primero a la superficie del diente, llamados colonizadores primarios, y aquellos más cerca del epitelio gingival, llamados colonizadores secundarios. Se aprecia que *F. nucleatum* interactúa con más de una bacteria a la vez. Una vez adherida a la biopelícula en desarrollo, *F. nucleatum* logra interactuar y coagregar con *P. gingivalis* mediante las adhesinas del primer microorganismo. Modificado de Brennan y Garrett, 2019 [54].

En concordancia con el rol de puente que presenta *F. nucleatum* en la biopelícula subgingival, se ha observado que *F. nucleatum* es capaz de coagregar con un gran número de bacterias orales, destacando su estrecha interacción con microorganismos pertenecientes al género *Bacteroides*, como por ejemplo con *P. gingivalis* [57]. Recientemente, se ha explorado el papel que jugaría *F. nucleatum* en la cavidad oral, expandiendo dicho rol hacia uno de puente metabólico entre las especies de la biopelícula subgingival, favoreciendo así el crecimiento de la biopelícula de *P. gingivalis* y su dispersión, es decir, la expansión del hábitat de esta última bacteria, lo que podría reflejarse en una mayor patogenicidad de la comunidad microbiana [58]. Por otro lado, en estudios de metatranscriptómica de muestras provenientes de placa subgingival de pacientes con periodontitis, se determinó -mediante técnicas de secuenciación de RNA- una alta similitud en el perfil metabólico de estas muestras (expresión génica de determinadas enzimas relacionadas al metabolismo bacteriano) a pesar de la alta

variabilidad del microbioma, lo que sugiere que la transición de salud a enfermedad periodontal está más asociada al metabolismo de la comunidad microbiana que a la presencia de una especie en particular [59].

A lo largo de los últimos años, se ha clasificado a *F. nucleatum* como parte de la microbiota *core*, es decir, cuya abundancia relativa y prevalencia no fluctúa en salud o periodontitis, por lo que se ha propuesto a este microorganismo como una piedra angular metabólica dentro de las interacciones que ocurren en la cavidad oral [2]. Sin embargo, el estudio realizado por Abusleme *et al*, 2021, demostró que la abundancia de *Fusobacterium spp* sí aumenta en gingivitis y periodontitis respecto a salud, nuevamente evidenciando el rol que podría tener esta bacteria en la patogénesis de la periodontitis [12]. Tomando en consideración que *F. nucleatum* está asociado a enfermedades sistémicas como cáncer colorrectal y oral, es importante expandir nuestro conocimiento sobre el rol de este microorganismo en el contexto de una comunidad polimicrobiana como la cavidad oral, especialmente en un contexto de disbiosis como se da en la periodontitis [58].

1.5.1 Factores de virulencia de *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum presenta un diverso abanico de factores de virulencia, los cuales utiliza para lograr la adhesión e invasión del tejido a infectar, además de permitir su unión con otros microorganismos pertenecientes a la microbiota oral, y contribuir a la patogénesis de la periodontitis y otras enfermedades extraorales como el cáncer colorrectal. Dichos factores de virulencia son el LPS, sus diversas adhesinas y una serie de enzimas denominadas serina proteasas que utiliza para la destrucción del tejido periodontal y la adquisición de nutrientes [60].

Se ha reportado que *F. nucleatum* se adhiere e invade GECs, gatillando así la secreción de IL-8 [56]. Asimismo, se evidenció que el LPS de este microorganismo induce un aumento en los niveles de mRNA de IL-8 y TNF- α en este tipo celular [61]. En estudios en líneas de macrófagos, se reportó que el LPS aislado desde cultivos de *F. nucleatum* no promovió ni inhibió el proceso apoptótico en estas células, sin embargo, sí generó un incremento en la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, lo cual -en un contexto de periodontitis- induce la resorción de hueso alveolar [62]. En

estudios realizados en células epiteliales de cáncer colorrectal, se demostró que el LPS de *F. nucleatum* activa al receptor TLR4, promoviendo la activación del factor de transcripción NF- κ B y produciendo así un aumento en la proliferación e invasión celular [63].

Otro factor de virulencia a destacar de *F. nucleatum* son sus adhesinas: FadA, Fap2 y RadD, las cuales se definen como moléculas adhesivas en las superficies de las bacterias que interactúan con los receptores de las células a infectar, facilitando así la adhesión e invasión a varios tipos celulares [64]. Entre estas, la más estudiada es la adhesina RadD, cuya función comprende la interacción de *F. nucleatum* con múltiples organismos tales como levaduras y bacterias, todos pertenecientes a la microbiota oral, permitiendo así cumplir el rol de puente de *F. nucleatum* descrito anteriormente [54]. Por otro lado, se ha reportado que la adhesina FadA es esencial para la adhesión e invasión de *F. nucleatum* a células epiteliales. Además, se ha reportado que esta adhesina promueve un aumento en los niveles de NF- κ B y un incremento en la expresión de IL-6 e IL-8, asimismo, en un modelo de cáncer colorrectal, se ha evidenciado que FadA puede modular ciertas respuestas tumorogénicas tales como el aumento en la proliferación celular [65]. Finalmente, se ha determinado que *F. nucleatum* evade exitosamente la respuesta inmune del hospedero mediante su adhesina Fap2, la cual, además de permitir el reconocimiento y unión del tejido epitelial a infectar, permite la unión de *F. nucleatum* con el receptor TIGIT expresado en células inmunes tipo *natural killer* (NK) y en linfocitos, inhibiendo así la función citotóxica de estas células y facilitando la supervivencia de *F. nucleatum* [66]. En un contexto de cáncer, la subversión inmune descrita anteriormente producto de la unión de Fap2 al receptor TIGIT evitaría la muerte de las células tumorales por parte de la acción del sistema inmune del hospedero [66].

A lo largo de los últimos años, la patogenicidad y tumorogenicidad de *F. nucleatum* se ha explicado debido a su capacidad de inducir una respuesta proinflamatoria al incrementar la expresión de citoquinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 en células epiteliales de colon, lo cual puede causar displasia y el desarrollo de cáncer [66]. Al tomar todo lo descrito anteriormente, junto con lo expuesto respecto al efecto de la infección por *P. gingivalis*, se puede establecer la relación entre ambos microorganismos y un mayor riesgo de cáncer, específicamente OSCC, debido a las diferentes vías de señalización

que activan y a la respuesta inflamatoria de carácter crónico que gatillan. En base a lo anterior, y a la importancia que ambas bacterias poseen en la patogénesis de la periodontitis, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha cocultivado o coinfectado con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* con el objetivo de describir en mayor detalle el impacto de la interacción entre estos microorganismos.

1.6 Interacción entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* y su efecto en periodontitis y tumorigénesis oral

Ambas bacterias se localizan en el margen subgingival, específicamente en la biopelícula subgingival. Se ha reportado que el valor de pH en dicha ubicación es igual a un valor aproximadamente neutro, lo cual es óptimo para el crecimiento de *P. gingivalis* [67]. Sin embargo, en el saco periodontal, al haber abundancia de compuestos nitrogenados por destrucción del periodonto, el valor de pH puede disminuir, variando hacia un ambiente ácido. *F. nucleatum* es capaz de aumentar el pH y mantenerlo dentro de un rango neutro nuevamente al neutralizar los ácidos presentes mediante la producción de ciertos compuestos básicos [67].

En vista de que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* coagregan al ser cultivadas en conjunto [57], se realizaron estudios con el fin de dilucidar el efecto que esta interacción física entre ambas bacterias podría tener. Entre dichas investigaciones, se observó que *F. nucleatum* facilita la supervivencia de *P. gingivalis* en ambientes oxigenados, permitiendo la existencia de *P. gingivalis* en otras comunidades orales como, por ejemplo, en la biopelícula ubicada en la superficie supragingival dental [68]. Esta biopelícula puede actuar como un reservorio de *P. gingivalis*, lo que podría permitir la continua reinfección y/o diseminación de esta bacteria hacia los sitios subgingivales [69]. Asimismo, la presencia de ciertos microorganismos como *P. gingivalis* en la comunidad supragingival se asocia con un agravamiento de los signos clínicos de la periodontitis debido a la activación del receptor TLR4 y de su vía de transducción [69]. Por otro lado, se realizaron estudios proteómicos a través de modelos de comunidad entre *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *Streptococcus gordonii*, en el cual se observó que se producen cambios en la expresión de proteínas de *P. gingivalis* de tal manera de proveer de un soporte fisiológico a esta bacteria en términos de integridad de su DNA, de un incremento

en su contenido ribosomal y un mayor consumo de hemina, lo cual impacta en la virulencia de este microorganismo [70,71].

A lo largo de los últimos años ha aumentado el número de investigaciones referentes a las interacciones polimicrobianas en un contexto de periodontitis, debido a que los microorganismos que componen la microbiota oral interactúan de manera sinérgica o antagónica, lo cual impacta en la patogénesis de la enfermedad [72,73,74]. En estudios de coinfección de GECs por parte de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, se observó que *F. nucleatum* aumenta el potencial de invasión del patobionte *P. gingivalis* en comparación a las infecciones de las bacterias por sí solas (monoinfecciones) [72]. Este aumento en la internalización de *P. gingivalis* en GECs tras coinfectar con *F. nucleatum* sería mediado por un mecanismo dependiente de balsas lipídicas, con el objetivo de evitar la degradación intracelular del patobionte y/o prevenir su destrucción por el sistema inmune del hospedero [73]. Por otro lado, en un modelo murino, se determinó que al coinfectar con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* se indujo una mayor liberación de IL-1 β y TNF- α en comparación a las monoinfecciones y un aumento sinérgico en la resorción de hueso alveolar, lo cual probablemente fue debido al incremento en la secreción de las citoquinas proinflamatorias antes mencionadas, ya que ambas se relacionan con la destrucción del tejido oral [74].

En el contexto de la relación de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* con un mayor riesgo de OSCC, se realizó una investigación en un modelo murino de periodontitis asociado a tumorigénesis oral, extrayéndose epitelio lingual para su estudio post coinfección con las bacterias en cuestión [75]. En esta investigación, se reportó que la coinfección crónica de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* incrementó la expresión de IL-6 y TNF- α , además de causar la subsiguiente activación de STAT3 (pSTAT3), la cual es una molécula ligada a procesos oncogénicos como el aumento en la proliferación celular, la supresión de la apoptosis y el comportamiento agresivo de los tumores [75]. Adicionalmente, en el mismo estudio antes mencionado, utilizando cultivos *in vitro* de células derivadas de epitelio lingual sometidas a la coinfección con *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, se reportó que el aumento en la expresión de IL-6 y TNF- α observado previamente en el modelo murino *in vivo*, se debía principalmente a la activación del receptor TLR y su factor de transcripción río abajo NF- κ B [75].

Durante un cocultivo bacteriano se producen una serie de interacciones célula-célula que impactarán en uno o ambos microorganismos, por ejemplo, existe la posibilidad de apreciar cambios en los perfiles de expresión proteica de las bacterias cultivadas [70]. Los modelos de cocultivos han sido considerados como una aproximación adecuada para comprender las múltiples interacciones entre los organismos procariontes que componen la microbiota oral, con el fin de dilucidar la patogénesis de enfermedades orales y explorar terapias nuevas para tratarlas [76]. Entre estas investigaciones, se destaca la sinergia en la capacidad de formación de biopelícula que exhibe *F. nucleatum* al ser cultivada en conjunto con *P. gingivalis* en comparación a sus cultivos individuales (monocultivos), lo cual podría correlacionarse con una mayor protección contra mecanismos de defensa del hospedero como fagocitosis o agentes antimicrobianos [77]. Asimismo, en una investigación *in vitro* realizada en una línea celular de monocitos, se realizó la extracción y purificación del LPS de *P. gingivalis* proveniente de un monocultivo, y de un cocultivo de *P. gingivalis* junto con *F. nucleatum*, con el objetivo de estimular los monocitos con dicho factor de virulencia purificado. Los autores reportan que el LPS del patobionte *P. gingivalis* proveniente del cocultivo con *F. nucleatum* indujo un aumento sinérgico en la expresión y secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-8, lo cual se interpreta como un incremento en la virulencia del LPS de *P. gingivalis* al ser cocultivada con *F. nucleatum* en comparación al LPS proveniente del monocultivo [78].

En base a estos antecedentes y debido a que, en un cuadro de periodontitis, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* presentan un efecto sinérgico activando vías inflamatorias similares, es factible plantear que estos microorganismos tienen un efecto similar en el proceso de transformación celular de GECs. Lo anterior involucra la activación de los receptores TLR (como el TLR4) y la producción de moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8.

1.7 Citoquinas proinflamatorias y su relación con la destrucción periodontal y tumorogénesis oral

Como se ha mencionado anteriormente, la periodontitis es una enfermedad oral que produce la inflamación crónica del tejido oral. Durante esta patología, los microorganismos de la biopelícula oral gatillan la liberación de las llamadas citoquinas desde las células inmunes y el tejido epitelial, las cuales generan daño irreversible al periodonto. Además, se ha reportado que los mediadores inflamatorios secretados en la cavidad oral pueden causar enfermedades sistémicas de carácter inflamatorio como artritis reumatoide, diabetes mellitus, aborto espontáneo, patologías pulmonares y enfermedades cardiovasculares [79]. Es más, en base a las investigaciones recientes es aceptado que alrededor de un 25% de las malignidades humanas se encuentran relacionadas a la inflamación crónica debido a infecciones bacterianas o virales [83].

Las citoquinas se definen como pequeñas proteínas solubles -cuyo peso molecular varía entre 5-20 kDa- que, al unirse a su receptor afín, regulan una gran gama de funciones celulares y genéticas como el control de la proliferación y diferenciación celular, migración y la respuesta inmune del hospedero, entre otras [79]. Un subtipo de citoquinas son las quimioquinas, las cuales estimulan la resorción ósea y/o reclutan células inmunes como leucocitos, macrófagos o neutrófilos al área de inflamación la cual, en un contexto de periodontitis, sería el margen subgingival, entre otras [80].

A lo largo de los últimos años se ha demostrado que una amplia gama de citoquinas juega un rol crucial en la patogénesis de la periodontitis, de tal manera de promover la destrucción del tejido de soporte del diente. Entre estas se encuentran TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, entre otras [79]. La citoquina proinflamatoria TNF- α regula la migración celular, promoviendo así la expresión de moléculas de adhesión y de ciertas quimioquinas e interleuquinas como IL-1 β e IL-6, además, posee un papel pivotal en la resorción de hueso alveolar y la pérdida del tejido conectivo [81]. Asimismo, en un contexto de OSCC, TNF- α promueve la progresión tumoral mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B, regulando procesos como la invasión y migración, proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis tumoral [82].

Por otro lado, IL-1 β es una citoquina proinflamatoria e inmunomoduladora que gatilla la activación de ciertas vías de señalización antiapoptóticas y promigratorias como la Akt, MAPK y ERK [81]. Es más, se ha reportado que la cascada de señalización de IL-1 β contempla la activación de NF- κ B, además de causar un incremento en la expresión y secreción de metaloproteínasa 9 (MMP-9), la cual es una proteasa que degrada la matriz extracelular y, por ende, remodela el tejido periodontal mediante la destrucción del tejido conectivo [81]. Asimismo, se ha determinado que esta citoquina sería una de las inductoras más potentes de la resorción ósea alveolar [84]

La IL-6 también juega un rol primordial en la destrucción del tejido periodontal al promover la resorción del hueso alveolar [79]. Es más, en modelos de ratones que sufrieron delección del gen codificante de IL-6, al estimularlos mediante sonda con *P. gingivalis*, sufrieron una menor pérdida de hueso alveolar en comparación a ratones *wild-type* [80]. Asimismo, se ha observado que esta interleuquina induce la resorción de hueso alveolar por sí sola o de manera sinérgica junto con IL-1 β [84]. Se ha reportado que la unión de IL-6 con su receptor conlleva a la activación de la vía JAK/STATs, culminando en la promoción de la proliferación celular, la angiogénesis y la invasión [85]. Es más, en un contexto de OSCC, la IL-6 puede promover el inicio de la tumorigénesis y/o progresión tumoral mediante la inhibición de la diferenciación de las células dendríticas, induciendo así la tolerancia inmune del tumor naciente y facilitando su diseminación metastásica [83].

Por último, se destaca la IL-8, la cual es una quimioquina que actúa como quimioattractante de células inmunes al sitio de inflamación [79]. Se ha reportado que IL-8, al unirse a su receptor, gatilla la activación de STAT3 y promueve así la proliferación celular y angiogénesis [85]. Además, se ha determinado que la cascada de transducción de esta citoquina induce activación de ciertos factores de transcripción (como NF- κ B) y la subsecuente expresión de múltiples genes asociados a funciones como la angiogénesis, la regulación del ciclo celular, migración e invasión y la evasión de la apoptosis [86]. Asimismo, en estudios realizados en pacientes afectados con OSCC, se reportaron niveles elevados de esta citoquina en muestras salivales en comparación a sujetos sanos o con lesiones premalignas [83].

En virtud de todo lo expuesto, en este trabajo se propone que la interacción entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* posee un efecto sinérgico que se traduce en la activación del receptor TLR4 y la translocación del factor de transcripción NF- κ B, aumentando la proliferación celular y gatillando la liberación de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, permitiendo así comprender de mejor manera el vínculo entre la inflamación crónica generada durante la periodontitis y la progresión a cáncer oral.

2. Hipótesis

La infección con el cocultivo de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* aumenta de manera sinérgica la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y la viabilidad celular en cultivos celulares línea OKF6/TERT2 mediante la vía TLR4/NF-kB.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la contribución del cocultivo de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias y viabilidad celular en cultivos OKF6/TERT2, mediante la cascada de señalización del receptor TLR4.

3.2 Objetivos específicos

- 1)** Determinar el efecto del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en células OKF6/TERT2.
- 2)** Determinar la contribución del receptor TLR4 en la vía de NF-kB y su efecto en la viabilidad celular de células OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

4. Materiales y métodos

4.1 Instrumentos y equipos

El laboratorio cuenta con una variedad de instrumentos y equipos, a los cuales se les dio el uso requerido dependiendo del experimento a realizar. Dichos equipos son: dos cámaras de flujo laminar (FiltroMet, Biosafety Level II type A), una cámara anaeróbica (Shell lab) con bomba de vacío, un incubador (LabTech) y jarras de anaerobiosis. Adicionalmente, cuenta con un sistema de electroforesis (BioRad), una fuente de poder para el procedimiento antes mencionado (PowerPac, BioRad), fotodocumentador (Aplegen, OmegaLumG), NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Remi), balanzas analíticas, una centrífuga de eppendorfs (5417R) y de tubos de 15 mL y 50 mL (ThermoFisher, Heraeus Megafuge 8R), 2 baños termostáticos (Mettler WNB7), 2 microscopios binoculares (Zeiss), refrigeradores comunes y un congelador a -80°C (ThermoFisher), un freezer de -20°C , 2 lupas estereoscópicas, 1 agitador vortex (ThermoFisher and Sprout), un espectrofotómetro (Dynamica Halo RB-10), un termociclador (Axygen) y un equipo de qPCR (Applied Biosystem ThermoFisher QuantiStudio3). Además, cuenta con un cuarto aislado de cultivo celular con un microscopio invertido (Primo Vert), un incubador de CO_2 para cultivos celulares (Nuair autoflow 8500) y una cámara Neubauer Marienfeld. De manera adicional, está disponible para su uso un cuarto de lavado con autoclave para la preparación de material y soluciones estériles, y la eliminación de material contaminado.

Finalmente, están disponibles algunos equipos e instalaciones compartidas dentro del Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), como el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) y el microscopio Nikon confocal C2. También, se encuentran disponibles para su uso ciertos equipos compartidos con laboratorios adyacentes -por ejemplo, el Laboratorio de Biología Periodontal- como el espectrofotómetro Synergy microplate reader (Biotek). Asimismo, se utilizó el microscopio electrónico de barrido JSM-IT300LV (JEOL) perteneciente al laboratorio SEM/EDX de microscopía electrónica de barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

4.2 Materiales y reactivos

Anaerogen BD GasPak™ EZ (Becton Dickinson (BD), *Franklin Lakes, NJ, EEUU*), Infusión de Cerebro-Corazón BHI (OXOID, Ltd, *Basingstoke, Hants., Inglaterra*), hemina (Calbiochem, *San Diego, CA, EEUU*), menadiona (Sigma-Aldrich Co, *St. Louis, MO, EEUU*), L-cisteína (Merck, *Rahway, NJ, EEUU*), metronidazol (Sigma-Aldrich Co, *St. Louis, MO, EEUU*), gentamicina (US biological, *Salem, MA, EEUU*), tripsina-EDTA (Hyclone, *Logan, UT, EEUU*), TRIZOL (Invitrogen, *Carlsbad, CA, EEUU*), medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero (KSFM) (Gibco, *Billings, MT, EEUU*) suplementado con extracto de pituitaria de bovino (Gibco, *Billings, MT, EEUU*), factor de crecimiento epidermal recombinante (Gibco, *Billings, MT, EEUU*), cloruro de calcio 0,3 M (Merck, *Rahway, NJ, EEUU*) y penicilina/estreptomicina (Biological industries, *Cromwell, CT, EEUU*). El laboratorio también cuenta con tampón fosfato salino (PBS) (Gibco, *Billings, MT, EEUU*), placas de cultivo de 100 mm, de 60 mm, de 24 mm, placas de 6 y de 96 pocillos (BD Falcon™, *Franklin Lakes, NJ, EEUU*), pipetas serológicas (BD Falcon™, *Franklin Lakes, NJ, EEUU*), Tris y azul tripán (Winkler Ltda, *Santiago, Chile*), Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher, *Waltham, MA, EEUU*), CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Madison, Wisconsin, EEUU; *Promega*), *cocktail* inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, *San Luis, MO, EEUU*), *cocktail* inhibidor de fosfatasa 2 y 3 (Sigma-Aldrich, *San Luis, MO, EEUU*), Acrylamide/Bis-acrylamide 40% solution (Sigma-Aldrich, *San Luis, MO, EEUU*), Clarity™ Western ECL Substrate (solución de peróxido y de luminol/*enhancer*) (BioRad, *Hercules, CA, EEUU*) y Albúmina de suero bovino (Winkler Ltda, *Santiago, Chile*).

4.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de referencia *P. gingivalis* W50 (ATCC 53978) y *F. nucleatum* ATCC 10953. Las cepas fueron incubadas en caldo BHI suplementado con 0,4 g/L de L-cisteína, 5 mg/mL de hemina y 5 mg/mL de menadiona. Para sus cultivos en medio sólido, se prepararon placas de agar sangre utilizando agar 1,5% y sangre desfibrinada de oveja al 5%, las cuales fueron suplementadas con hemina 1% y menadiona 1%. Las bacterias fueron incubadas en una atmósfera anaeróbica de 90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂ a 37°C por 3-4 días.

Para cultivar *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en medio planktónico (cultivo en medio BHI líquido), se tomaron colonias aisladas (inóculos) con un asa de platino desde una placa agar sangre suplementada acorde a lo mencionado anteriormente y se inoculó el medio líquido. Los tubos conteniendo dicho medio líquido fueron incubados por 20-24h en anaerobiosis a 37°C hasta la densidad óptica deseada, la cual varió dependiendo del experimento a realizar. Para lograr la anaerobiosis, se utilizaron jarras de anaerobiosis herméticas y un sobre generador de anaerobiosis (AnaeroGen), el cual genera un ambiente compuesto de 9-13% de CO₂ y menos del 1% de O₂. Alternativamente, se usó una cámara de anaerobiosis en el caso de no tener AnaeroGen disponible.

4.3.1 Condiciones de cocultivo bacteriano

Con el fin de obtener un cocultivo bacteriano entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, se incubaron monocultivos planktónicos de ambas bacterias a 37°C por 20-24 h hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,4. Luego, se realizó el cocultivo inoculando 250 µL del monocultivo de *P. gingivalis* y 4 µL del monocultivo de *F. nucleatum* en un tubo de ensayo con 10 mL de medio líquido BHI suplementado, obteniendo así una razón aproximada de 1:1 entre ambos microorganismos tras 24 h de crecimiento bajo condiciones anaeróbicas. La elaboración del cocultivo se llevó a cabo considerando lo obtenido en las curvas de crecimiento de las bacterias en cuestión, más específico, que para *P. gingivalis*, un caldo a una DO₆₀₀ de 0,6 contendrá 1x10⁸ bacterias/mL, y para *F. nucleatum*, un caldo a una DO₆₀₀ de 0,6 contendrá 2,5x10¹⁰ bacterias/mL. El medio utilizado para el cocultivo de ambas bacterias fue BHI suplementado con hemina 1%, menadiona 1% y 0,4 gr/L de cisteína, en anaerobiosis a 37°C.

4.3.2 Curvas de crecimiento de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*

Se realizaron diferentes inóculos iniciales de cada bacteria, a los cuales se les midió la DO₆₀₀ cada 1 hora de incubación en una atmósfera anaeróbica a 37°C. Al llegar a la fase exponencial de crecimiento, se realizaron diversas diluciones seriadas (hasta un factor de dilución (FD) de 1.000.000 o 10⁶). Luego, se sembraron 10 µL de cada dilución en agar sangre previamente suplementado y se incubaron las placas a 37°C en anaerobiosis por 2-3 días (en el caso de *F. nucleatum*) y por 5-7 días (en el caso de *P.*

gingivalis). Transcurrido este tiempo, se contaron las colonias obtenidas y se calcularon las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) de cada dilución.

4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Tras realizar el cocultivo entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* según lo estipulado en el apartado 4.3.1, además de los monocultivos en caldo de ambos microorganismos (acorde a lo descrito en 4.3), se procedió a tomar una alícuota de 1 mL de cada muestra para luego depositarla en un eppendorf de 1,5 mL. A continuación, se centrifugaron las muestras a 4500 revoluciones por minuto (RPM) por 5 minutos a temperatura (T°) ambiente. Realizado lo anterior, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en agua destilada MiliQ, para luego centrifugar nuevamente a 4500 RPM, por 5 minutos, a T° ambiente. Este proceso de lavado con agua destilada MiliQ se repitió un total de 2 veces. Luego, se descartó el sobrenadante y se procedió a resuspender el sedimento bacteriano obtenido en 400 µL de glutaraldehído a una concentración de 2,5%, para finalmente forrar cada tubo con muestra en papel metálico y guardar las muestras a 4°C hasta su evaluación en el microscopio electrónico de barrido, gentileza del Laboratorio SEM/EDX de Microscopía Electrónica (LME) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este equipo fue operado por la Tecnóloga Médica Rocío Orellana Fernández.

4.5 Ensayo de Unidades formadoras de Colonias del cocultivo

El cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* fue realizado acorde a lo descrito en el apartado 4.3.1. Tras lo anterior, se llevó a cabo una dilución seriada utilizando un factor de dilución de 1:10 del cocultivo en medio BHI suplementado, hasta alcanzar como máximo a un factor de dilución de 10⁶. A continuación, con el objetivo de romper las interacciones físicas entre ambas bacterias y obtener colonias separadas para su conteo, se realizó un proceso de sonicación sobre hielo de las diluciones 10⁵ y 10⁶ por 10 segundos a una amplitud del 20%. Luego, en una placa agar sangre suplementada, se sembraron 200 µL de dichas diluciones y se incubaron a 37°C, en anaerobiosis por 24 h, 48 h y 96 h. Tomando en consideración que la curva de crecimiento de ambos microorganismos es distinta en términos de velocidad de crecimiento, a las 24-48 h de

incubación se contaron las UFC/mL de *F. nucleatum* mientras que, a las 96 h de incubación se contaron las UFC/mL formadas por *P. gingivalis*.

4.6 Línea de cultivo celular y condiciones de cultivo

Se utilizaron queratinocitos humanos orales línea OKF6/TERT2, las cuales fueron incubadas en medio KSFM suplementado con pituitaria de bovino 25 µg/mL, factor de crecimiento epidermal 0,2 ng/mL, cloruro de calcio 0,3 M y los antibióticos penicilina/estreptomicina y posteriormente incubadas a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% CO₂.

Las células se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 70-80% en forma de monocapa antes de realizar los experimentos. Para traspasar las células de una placa a otra, las monocapas fueron lavadas 2-3 veces con PBS y luego se les agregó 1 mL de tripsina-EDTA, para luego incubar por 3 minutos a 37°C. A continuación, se diluyó la tripsina con 5 mL de PBS, se soltaron las células mediante repipeteo, se depositó dicho volumen en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1300 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 1 mL de medio KSFM con penicilina/estreptomicina. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión homogeneizada y se mezcló en una relación de 1:10 con una solución azul tripán al 0,4%. Finalmente, se contaron las células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido, para luego sembrar la cantidad de células requerida para cada experimento.

4.6.1 *Knockdown* del receptor TLR4

Para realizar el *knockdown* del receptor TLR4 y así generar una línea celular shTLR4 estable, se llevó a cabo una colaboración con el laboratorio de Virología Molecular y Celular del Dr. Fernando Valiente para obtener las partículas lentivirales conteniendo el plasmidio codificante del *small hairpin RNA* (shRNA) contra TLR4. Este vector viral comercial consistía en partículas lentivirales anfotrópicas (partículas que infectan un amplio rango de tipos celulares) conteniendo un plasmidio pLKO-1 (**Figura 27**, revisar material suplementario) que constaba de: una secuencia codificante para un shRNA contra el gen de interés (en este caso, el gen codificante del receptor TLR4); un *cassete*

de resistencia a puromicina para la selección en células eucariontes; un *cassete* de resistencia a ampicilina para la selección bacteriana, un origen de replicación (pUC ori), una secuencia de señalización de empaquetamiento de RNA (Psi), etc. Cada vector lentiviral utilizado fue purificado a partir de cultivos de *E. coli* previamente transformados por el fabricante (Mission shRNA Bacterial Glycerol Stock, Sigma-Aldrich).

Para realizar la transducción viral, se sembraron 300.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos Falcon y se incubaron por 24 h a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se procedió a lavar las células 2 veces con PBS, se agregaron 2 mL de la suspensión viral y luego se incubó por 24h. Tras esto, se lavaron las células con PBS 3 veces y se les agregó medio KSFM fresco con antibióticos más 0,5 µg/mL de puromicina, de tal manera de seleccionar el plasmidio y evitar que las células lo curen. Esta línea de células *knockdown* de TLR4 se incubó siempre en presencia de 0,5 µg/mL de puromicina. El nivel de silenciamiento del gen codificante del receptor TLR4 se evaluó mediante la técnica de Western blot (revisar material suplementario).

4.7 Protocolo de infección celular con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* y el cocultivo de ambas bacterias

Tras sembrar la cantidad de células requerida por experimento (acorde a lo estipulado en apartado 4.6), se procedió a lavar y agregar medio KSFM suplementado y sin antibióticos al menos 20 h antes de realizar los experimentos.

Los inóculos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* fueron preparados acorde a lo descrito en el apartado 4.3. Los cultivos bacterianos en caldo se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ = [0,6-0,9]). A continuación, se tomó el volumen necesario para infectar los cultivos celulares línea OK6/TERT2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 100, tomando en consideración que -a una DO₆₀₀ =0,6 - un cultivo líquido contendrá 1x10⁸ bacterias/mL y 2,5x10¹⁰ bacterias/mL para *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, respectivamente. Lo anterior se considera como “tiempo 0”. Se contó con 5 condiciones experimentales: un control negativo de células sin infectar, la mono infección con *P. gingivalis*, la mono infección con *F. nucleatum*, la infección con el cocultivo (**Figura**

4A) de ambas bacterias y la coinfección (**Figura 4B**) de ambos microorganismos. Todas las condiciones siempre considerando una MOI final de 100.

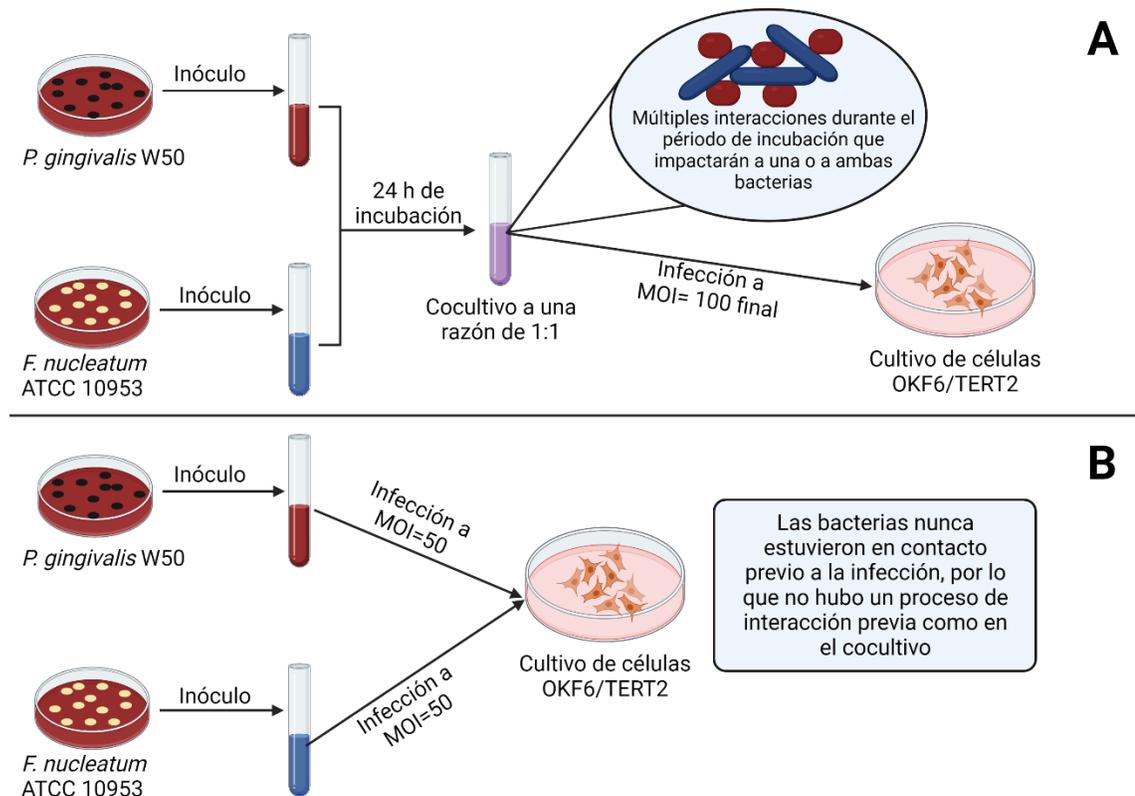


Figura 4. Diferencia experimental entre el cocultivo y la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. (A) Se esquematiza el fundamento del cocultivo entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Durante el cocultivo bacteriano ocurrirán múltiples interacciones entre las bacterias que impactarán a una o a la otra. Todo lo anterior previo a la infección de los cultivos celulares OKF6/TERT2. (B) Esquema referente a la coinfección con *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Se puede apreciar que no hubo una incubación en la que las bacterias pudiesen interactuar previo a la infección de GECs.

Tras 90 minutos de infección a 37°C y 5% de CO₂, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio KSFM suplementado con 300 µg/mL de gentamicina y 200 µg/mL de metronidazol por 24 h, a 37°C y 5% de CO₂. Realizado lo anterior, se

llevaron a cabo los experimentos de MTS, Western blot, qPCR, azul de tripán e inmunofluorescencia indirecta.

4.8 Ensayo de viabilidad celular MTS

En una placa de 96 pocillos, se sembraron 25.000 células por condición experimental, en triplicado técnico, acorde a lo descrito en el apartado 4.6. El protocolo de infección se llevó a cabo según lo estipulado en el apartado 4.7. Transcurridas 24 h del procedimiento de infección celular, se procedió a lavar 2-3 veces con PBS estéril y luego se agregaron 100 μ L de medio KSFM suplementado con antibióticos a cada pocillo. A continuación, se incubó cada pocillo con 20 μ L del reactivo MTS según lo descrito por el fabricante (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) por 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente, se procedió a evaluar la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro de placas.

4.9 Ensayo de Western blot

Se procedió a sembrar 2.000.000 de células OKF6/TERT2 y shTLR4 por condición experimental según lo descrito en el apartado 4.6. Realizado el protocolo de infección celular (acorde a lo estipulado en el apartado 4.7), se lavaron las células con PBS frío y, sobre hielo, se llevó a cabo la lisis celular utilizando 80-100 μ L de buffer RIPA frío suplementado con *cocktails* inhibidores de proteasas y fosfatasa según las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). A continuación, utilizando un rastrillo celular, se lisaron las células mecánicamente y la suspensión obtenida se depositó en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Para contribuir a la lisis, se utilizó la técnica de repipeteo. Luego, se centrifugaron las muestras a 10.000 RPM, a 4°C por 10 minutos y se rescató el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL. A continuación, se procedió a cuantificar la concentración total de proteínas mediante el método BCA, para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Realizado lo anterior, las muestras se separaron por tamaño molecular mediante la técnica SDS-PAGE. Para esto, se elaboró un gel de acrilamida/bis-acrilamida al 10% y se cargaron 50 μ g de muestra proteica por cada condición experimental, para luego proceder a transferir *overnight* las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Tras esto, las membranas fueron bloqueadas por 2

horas en una solución de albúmina de suero bovino (BSA) o leche descremada al 5%, ambas soluciones preparadas en tampón Tris-salino (TBS)-Tween 20 al 0,1% (TBS-T). Luego, las membranas fueron incubadas *overnight* a 4°C y agitación orbital a 60 RPM con los siguientes anticuerpos primarios monoclonales según correspondiese: anti-TLR4 (1:2.000) (Santa Cruz Biotechnologies, SC-293072), anti-NF- κ B (1:1.000) (Cell Signaling Technology, 8242S), anti-pNF- κ B (S536) (93H1) (1:1.000) (Cell Signaling Technology, #3033) y anti- β -actina (1:20.000) (Santa Cruz Biotechnologies, SC-47778), todos diluidos en una solución al 1% de BSA-TBS-T. Con el fin de revelar las proteínas de interés, se incubó con los anticuerpos secundarios IgG anti-mouse o anti-rabbit (1:5000, ambos) acoplados a la enzima peroxidasa de rabanito (HRP), según correspondiese. Finalmente, se utilizó el kit Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) para detectar los anticuerpos primarios unidos a las proteínas de interés. Las bandas obtenidas se cuantificaron mediante densitometría (utilizando el software ImageJ), la cual se basa en el número de píxeles de las bandas obtenidas y es proporcional a la cantidad de proteína de interés de la muestra, es decir, a mayor número de píxeles obtenidos mayor es la cantidad de la proteína de interés evaluada. Como control de carga se utilizó β -actina puesto que las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo no afectan los niveles de esta proteína [115].

4.10 Reacción de polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Se procedió a sembrar 1.000.000 de células OKF6/TERT2 y shTLR4 acorde a lo estipulado en el apartado 4.6. Las células se infectaron siguiendo las mismas condiciones experimentales y según lo descrito en el apartado 4.7. Para la extracción y purificación de mRNA se utilizó el método de TRIzol-cloroformo, y el material genético extraído se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer) a una longitud de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm. A continuación, se procedió -acorde a las instrucciones del fabricante- a tratar con DNasas utilizando la enzima DNase I (RNase-Free) (New England Biolabs, EEUU). Con el fin de convertir el mRNA a cDNA, se realizó una reacción de retrotranscripción (RT) empleando la enzima M-MLV (Promega, EEUU). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (Axygen, EEUU) acorde al siguiente programa termal: a 37°C por 60 minutos, luego a 70°C por 15 minutos y, finalmente, 4°C por tiempo indefinido. Se

depositaron 500 ng del cDNA obtenido en el paso previo en cada pocillo de la placa de 96 pocillos de qPCR y se utilizó el kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) para la amplificación del material genético en cuestión. Los partidores utilizados se exponen en la **Tabla 1**. La reacción de qPCR se llevó a cabo a una temperatura de *melting* ($T^{\circ}m$) de 60°C para todos los partidores. La estandarización de dicha temperatura y la curva de calibración de los partidores utilizados se encuentran en el material suplementario.

Gen de interés	Partidor <i>forward</i> (Fw)	Partidor <i>reverse</i> (Rv)
β -actina	CACCATTGGCAATGACGC GTTT	AGGTCTTTGCGGATGT CCACGT
TNF- α	CAGCCTCTTCTCCTTCCTG AT	GCCAGAGGGCTGATTA GAGA
IL-1 β	CCACAGACCTTCCAGGAG AATG	GTGCAGTTCAGTGATC GTACAGG
IL-6	AGACAGCCACTCACCTCTT CAG	TTCTGCCAGTGCCTCT TTGCTG
IL-8	GGCACAAACTTTCAGAGA CAG	ACACAGAGCTGCAGAA ATCAGG

Tabla 1: Lista de las secuencias de partidores *forward* y *reverse* utilizados para cada gen de interés.

Para el cálculo de la expresión génica relativa obtenida, se utilizó el método delta-delta CT (ddCT), siendo CT el valor umbral de ciclos. Esto mediante el previo cálculo del delta CT entre los genes de interés y los genes *housekeeping* (β -actina en este caso), valor que se restó a los delta CT individuales de cada control y muestra experimental, lo que permitió obtener el ddCT. Cada uno de los resultados obtenidos se elevaron al cuadrado para así obtener la expresión génica relativa.

4.11 Ensayo de azul tripán para viabilidad celular

Se procedió a sembrar 300.000 células OKF6/TERT2, acorde a lo estipulado en el apartado 4.6, en una placa de 6 pocillos. Las células fueron infectadas según lo descrito en el apartado 4.7. Cumplidas las 24 h post infección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS estéril y luego se les agregó 300 μ L de tripsina-EDTA, incubándose por 2 minutos y 30 segundos a 37°C y 5% de CO₂. Las células se soltaron mecánicamente mediante repipeteo y la suspensión obtenida se centrifugó a 1300 RPM, 10 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, el sedimento resultante se resuspendió en 1 mL de medio KSFM suplementado y se alicuotaron 50 μ L de cada suspensión celular, con el objetivo de diluirlas a una razón 1:2 con una alícuota de 40 μ L de medio KSFM y 10 μ L de azul tripán. Finalmente, se realizó el conteo de células viables utilizando una cámara de Neubauer en el microscopio invertido (Primo Vert).

4.12 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se procedió a sembrar 30.000 células OKF6/TERT2, acorde a lo estipulado en el apartado 4.6, en una placa de 24 pocillos conteniendo los cubreobjetos de 12 mm para inmunofluorescencia. Las células fueron infectadas según lo descrito en el apartado 4.7. Realizado lo anterior, se procedió a lavar con PBS frío 2 veces y a fijar las células utilizando una solución de paraformaldehído al 4%, por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó 2 veces con PBS frío y se permeabilizó con una solución de tritón X-100 al 0,3% por 30 minutos, a T° ambiente, con el fin de adquirir acceso al núcleo celular. Luego, se procedió a lavar con PBS frío 3 veces de manera estática y se incubó con una solución de BSA 5% por 1h, T° ambiente y en agitación suave (20-30 RPM) con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas. Los cubreobjetos fueron incubados *-overnight*, 4°C, en oscuridad y en atmósfera húmeda con los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: anti-TLR4 (1:200) (Santa Cruz Biotechnologies, SC-293072) y anti-TLR2 (1:100) (Cell Signaling Technology, 12276S), ambos diluidos en una solución de BSA 5%-PBS. Tras esto, se procedió a incubar con las soluciones de anticuerpos secundarios respectivos ligados a las sondas fluorescentes Alexa Fluor 488 y Faloidina Alexa Fluor 633, diluidas a un factor de 1:200, por 1 h, en oscuridad, T° ambiente y en una atmósfera húmeda. Los cubreobjetos fueron

luego lavados con PBS frío de manera estática y se sometieron a un lavado con una solución de PBS-Hoechst (1:10.000) por 10 minutos, compuesto que es capaz de unirse a regiones del DNA celular ricas en adenina y timina. A continuación, los cubreobjetos conteniendo la muestra experimental fueron montados y fijados en un portaobjetos de IFI utilizando una gota de medio de montaje Dako (Faramount Aqueous Mounting Medium, Merck), y luego se evaluaron en el microscopio FACS, Nikon confocal C2, cortesía del CEMC, perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.13 Ensayo de migración

Se procedió a sembrar 300.000 células OKF6/TERT2, acorde a lo estipulado en el apartado 4.6, en una placa de 6 pocillos para luego infectarlas según lo descrito en el apartado 4.7. Tras esto, se resuspendieron las células en medio KSFM libre de suero y se depositó en la cámara de Boyden (Transwell Costar, 6,5 mm de diámetro, tamaño de poro de 8 μm) previamente cubierta con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fibronectina. Además, en el fondo de la cámara, se añadió suero fetal bovino al 5% para así estimular la migración. Tras 2h de migración, las cámaras fueron lavadas gentilmente con PBS y luego se procedió a teñir las células migradas en la parte inferior de la cámara con cristal violeta 0,1% en 2% de etanol. A continuación, utilizando un microscopio invertido se realizó el conteo de las células migradas y teñidas.

4.14 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples del promedio de cada grupo de datos experimentales contra el control negativo sin infectar. Para analizar las diferencias significativas entre los datos de los experimentos con tres o más replicados biológicos, se utilizó el post-test de Dunn's. Las diferencias entre los datos se consideraron estadísticamente significativas si y solo si $p < 0,05$. Todos los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism (versión 8.0.2).

5. Resultados

5.1 Determinación del efecto del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en células OKF6/TERT2.

Anteriormente, se ha reportado que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* interactúan de distintas maneras al ser cocultivadas. Por ejemplo, *F. nucleatum* provee de soporte fisiológico a *P. gingivalis* al estar ambas presentes en el mismo cultivo, incrementando la virulencia del LPS de *P. gingivalis* al facilitar un mayor consumo de hemina de esta bacteria desde el medio extracelular [70,71]. Para lograr el cocultivo, era necesario evaluar la velocidad de crecimiento de estas bacterias, por lo que se elaboró la curva de crecimiento de los monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. En la **Figura 5A** se aprecia que, al aplicar logaritmo de base 10 a las UFC obtenidas, se obtiene una curva de tipo sigmoide para cada bacteria, donde se observa que *F. nucleatum* alcanza un valor cercano a 10 en el eje Y del gráfico en menor tiempo (eje X) que *P. gingivalis*, lo que demuestra que la fase exponencial de *F. nucleatum* es más rápida que la de *P. gingivalis*. Utilizando la ecuación de la recta se determinó que a una $DO_{600} = 0,6$ hay 1×10^8 bacterias/mL y $2,5 \times 10^{10}$ bacterias/mL de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, respectivamente. Al considerar la velocidad de la fase exponencial de ambos microorganismos y, tomando en cuenta lo obtenido a partir de la ecuación de la recta de sus respectivas curvas, se elaboró un cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* de tal manera que, tras 24 h de incubación a 37°C y anaerobiosis, ambas bacterias estuviesen aproximadamente en la misma cantidad (1:1), para evitar así observar el efecto de un microorganismo sobre el otro. Con la finalidad de lograr lo anterior, se realizó el conteo de las UFC/mL resultantes de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* tras ser cocultivadas acorde a las condiciones descritas anteriormente. Para esto, se realizó un proceso de sonicación, la dilución seriada del cocultivo y su subsiguiente siembra en una placa de agar sangre suplementada. Al contar las colonias independientes de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* resultantes del cocultivo y posteriormente calcular las UFC/mL, se observó que hay un mayor número de colonias de *F. nucleatum* que de *P. gingivalis*. Tras realizar la razón matemática entre las UFC/mL obtenidas de cada bacteria, se determinó que, tras 24h de crecimiento, se obtiene una razón promedio de 1: 1,3 entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, respectivamente (**Figura 5B**).

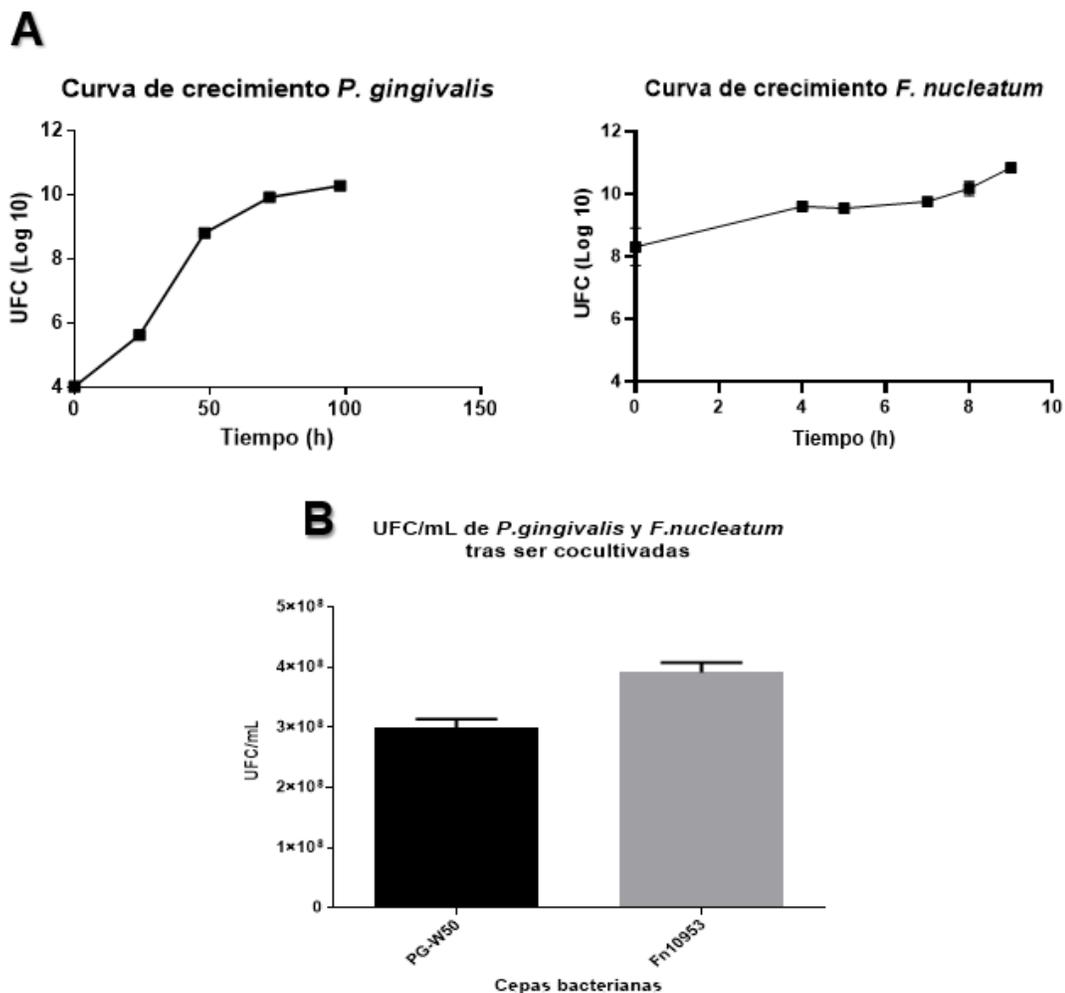


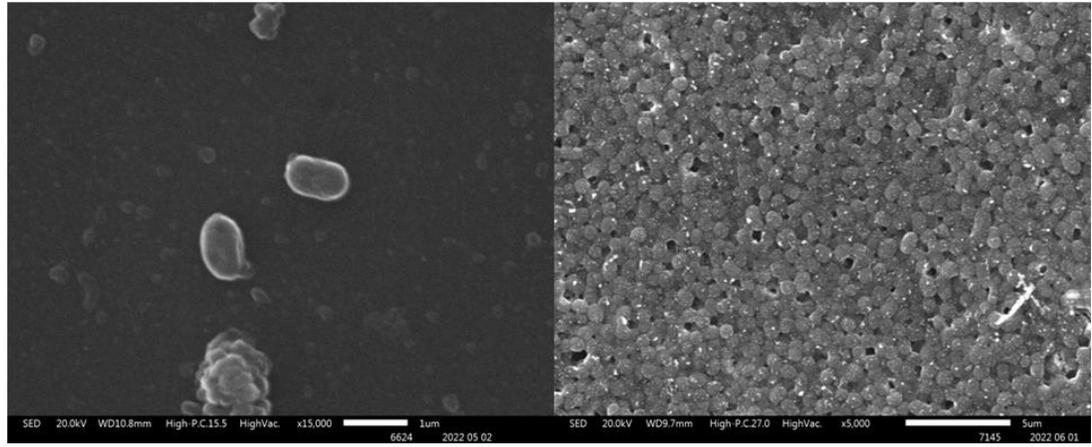
Figura 5. Curvas de crecimiento para monocultivos y conteo de las UFC/mL obtenidas al cocultivar *P. gingivalis* y *F. nucleatum* por 24 h. (A) Se observa la curva de crecimiento de *P. gingivalis* W50 y *F. nucleatum* ATCC 10953 tras contar las UFC/mL de las bacterias en cuestión al ser cultivadas en medio BHI/Cys suplementado con 5 mg/mL de hemina y 5 mg/mL de menadiona. (B) Se aprecia la razón obtenida al sonicar y contar las UFC/mL viables de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en una placa de agar sangre suplementada. (n=3).

Previamente, se ha demostrado que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* coagregan principalmente mediante las múltiples adhesinas de *Fusobacterium*, sin embargo, no hay reportes de la interacción entre las cepas *P. gingivalis* W50 y *F. nucleatum* ATCC 10953, las cuales se utilizaron en este trabajo [57]. Con el objetivo de analizar la posibilidad de interacción entre dichas cepas, se prepararon monocultivos de las bacterias y el cocultivo

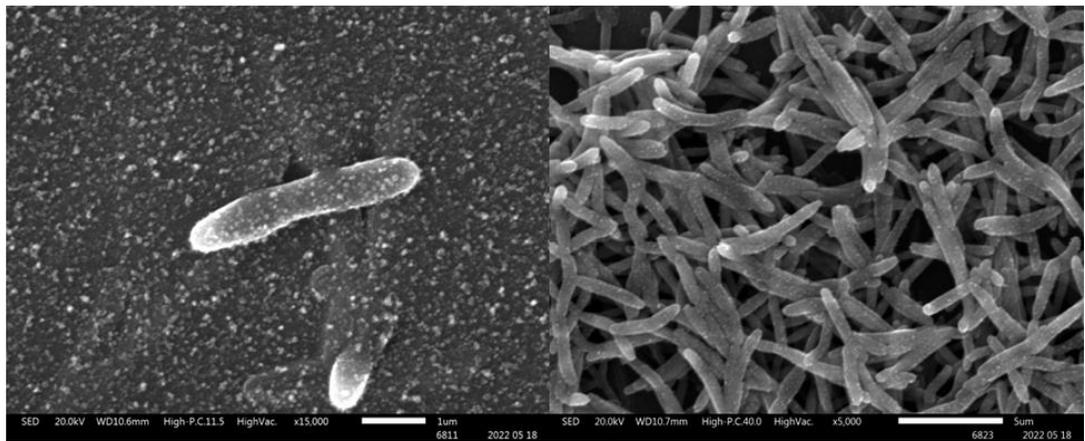
de ambas y se extrajo una alícuota para luego fijarla con glutaraldehído 2,5% con el fin de analizarla mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la **Figura 6A** se pueden apreciar las imágenes obtenidas mediante SEM de un monocultivo de *P. gingivalis*, que da cuenta de la morfología de cocobacilo que presenta esta bacteria (imagen capturada a x15.000 de aumento), además de su capacidad de organizarse frente a un estímulo estresor hídrico como la presencia de agua destilada (imagen capturada a x5.000 de aumento). Por otro lado, en la **Figura 6B** se observan imágenes capturadas por SEM de un monocultivo de *F. nucleatum*, la cual exhibe la morfología de bacilo alargado propia de este microorganismo (imagen capturada a x15.000 de aumento). Cabe destacar que esta morfología característica es importante al momento de cumplir su rol de organismo puente en la biopelícula subgingival, puesto que le permite interactuar con uno o más microorganismos a la vez, permitiendo así una comunicación interespecie eficaz [55]. En el panel derecho, se aprecia su capacidad de organizarse frente a un estímulo estresor hídrico como lo es el agua destilada (imagen capturada a x5.000 de aumento).

En la **Figura 6C** se pueden apreciar tres imágenes capturadas mediante SEM (tomadas a un aumento de x2.200, x15.000 y x14.000, respectivamente) del cocultivo de *P. gingivalis* W50 y *F. nucleatum* ATCC 10953. En estas imágenes se visualiza una interacción física y estrecha entre ambas especies, lo cual es indicado mediante una flecha roja en la figura. En la **Figura 6D**, se observan 3 imágenes adicionales del cocultivo capturadas mediante SEM a un aumento de x1.000, x5.000 y x10.000, respectivamente. En ellas, se visualiza que existe una cantidad similar de células de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, lo que sugiere que el cocultivo contendría una razón aproximada de 1:1 entre estas especies al ser incubado de acuerdo a las condiciones descritas en la metodología.

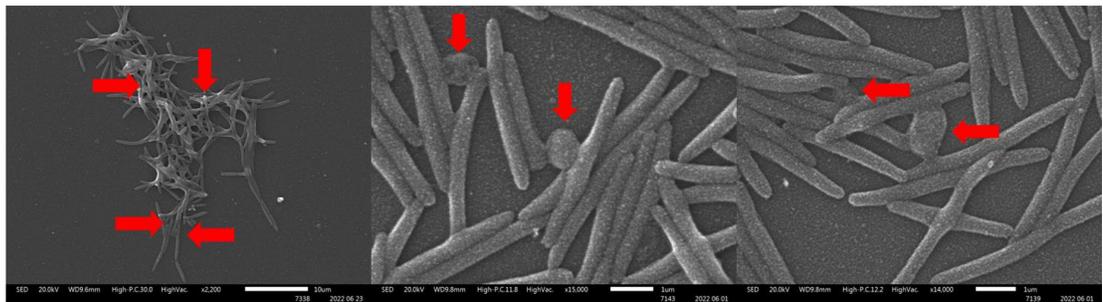
A



B



C



D

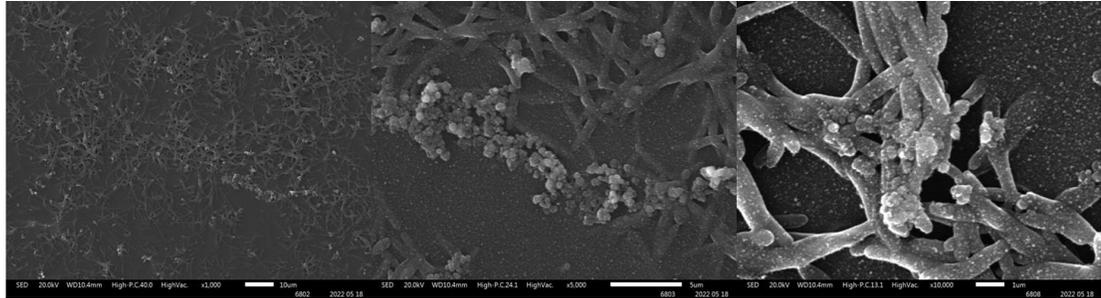


Figura 6. Microscopías electrónicas de transmisión de monocultivos y el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. (A) En el panel izquierdo (aumento x15.000) se observa la imagen de una SEM de un monocultivo de *P. gingivalis* que da cuenta de su morfología de cocobacilo, mientras que en el panel derecho (aumento x5.000) se aprecia una biopelícula de esta bacteria tras ser expuesta a agua destilada miliQ. (B) SEM para *F. nucleatum*. En el panel izquierdo (aumento x15.000) se muestra la morfología de bacilo de esta bacteria y, en el panel derecho (aumento x5.000), se observa la biopelícula formada al ser expuesto a agua destilada miliQ. (C) Microscopías SEM para el cocultivo. De izquierda a derecha (aumentos x2.200, x15.000 y x14.000) se aprecian diferentes secciones (señaladas con la flecha roja) en las que se observa a *P. gingivalis* y *F. nucleatum* interactuando físicamente. (D) Se aprecian microscopías SEM (de izquierda a derecha: aumentos de x1.000, x5.000 y x10.000 respectivamente) de las bacterias donde se aprecia una razón similar al ser cocultivadas por 24h.

Habiendo demostrado que, durante el cocultivo en las condiciones descritas, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* interactúan físicamente y se encuentran a una razón similar, se determinó el efecto que las monoinfecciones, la infección con el cocultivo y la coinfección con estos microorganismos generan sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en GECs. Se ha reportado en la literatura que estas citoquinas juegan un papel relevante en la patogénesis de la periodontitis al promover la destrucción del periodonto [79]. Entre estas se encuentran principalmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [79]. En este contexto inflamatorio, se estima que alrededor de un 25% de las malignidades humanas se encuentran relacionadas con la inflamación crónica a causa de las infecciones bacterianas y a los subsecuentes cambios celulares que ejercen las citoquinas proinflamatorias liberadas, siendo todos ellos relacionados a señales de identidad del cáncer [83]. Tomando en consideración los antecedentes anteriores, la sinergia

reportada en la literatura entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en un contexto de periodontitis [74,75] y las interacciones físicas observadas durante el cocultivo de ambas bacterias (**Figura 6**), se realizaron ensayos de qPCR para estudiar el efecto del cocultivo sobre la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y caracterizar si es de naturaleza sinérgica. Este ensayo se llevó a cabo según lo descrito en el 4.10 de este trabajo.

En la **Figura 7A, 7B, 7C, y 7D** se presentan las expresiones relativas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, respectivamente, todas expresadas como veces de cambio respecto al control sin infectar (control S/I) tras utilizar el método delta-delta CT. En la **Figura 7A** se observa que, tras infectar las células OKF6/TERT2 con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, se produjo un incremento en los niveles de mRNA de TNF- α , por lo que se determinó que el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta la expresión relativa de esta citoquina en comparación al control sin infectar (S/I). Sin embargo, se aprecia también que las infecciones de células OKF6/TERT2 con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* monocultivadas, además de la coinfección de ambas bacterias no alteraron los niveles de mRNA de TNF- α , lo que sugiere que estas condiciones experimentales no afectan la expresión relativa de TNF- α . Por otro lado, en la **Figura 7B** se puede observar que la infección de cultivos OKF6/TERT2 con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* y la coinfección de estas bacterias, producen un aumento en los niveles de mRNA de IL-1 β , a diferencia de la infección con los monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Por lo tanto, este resultado demuestra que la infección con el cocultivo y la coinfección de estos microorganismos aumentan la expresión relativa de IL-1 β . Asimismo, se evaluó la expresión génica relativa de IL-6. En la **Figura 7C** se aprecia que la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumentó los niveles de mRNA de esta citoquina de manera sinérgica, es decir, el incremento observado en los niveles del transcrito de IL-6 tras estimular con el cocultivo es mayor que la suma de los valores obtenidos tras infectar con los monocultivos *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, lo que demuestra que la infección de células OKF6/TERT2 con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta, de manera sinérgica, la expresión génica relativa de IL-6. De igual forma, en la **Figura 7D** se observa que, al infectar cultivos OKF6/TERT2 con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, se produce un incremento de carácter sinérgico en los niveles de mRNA de IL-8, es decir, que el aumento en los niveles de transcrito de esta citoquina

que produce la infección con el cocultivo bacteriano en células OKF6/TERT2, es mayor a la suma de los valores obtenidos para la infección con los monocultivos *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, por lo que es posible determinar que la infección con el cocultivo de estas bacterias aumenta, de manera sinérgica, la expresión génica relativa de IL-8.

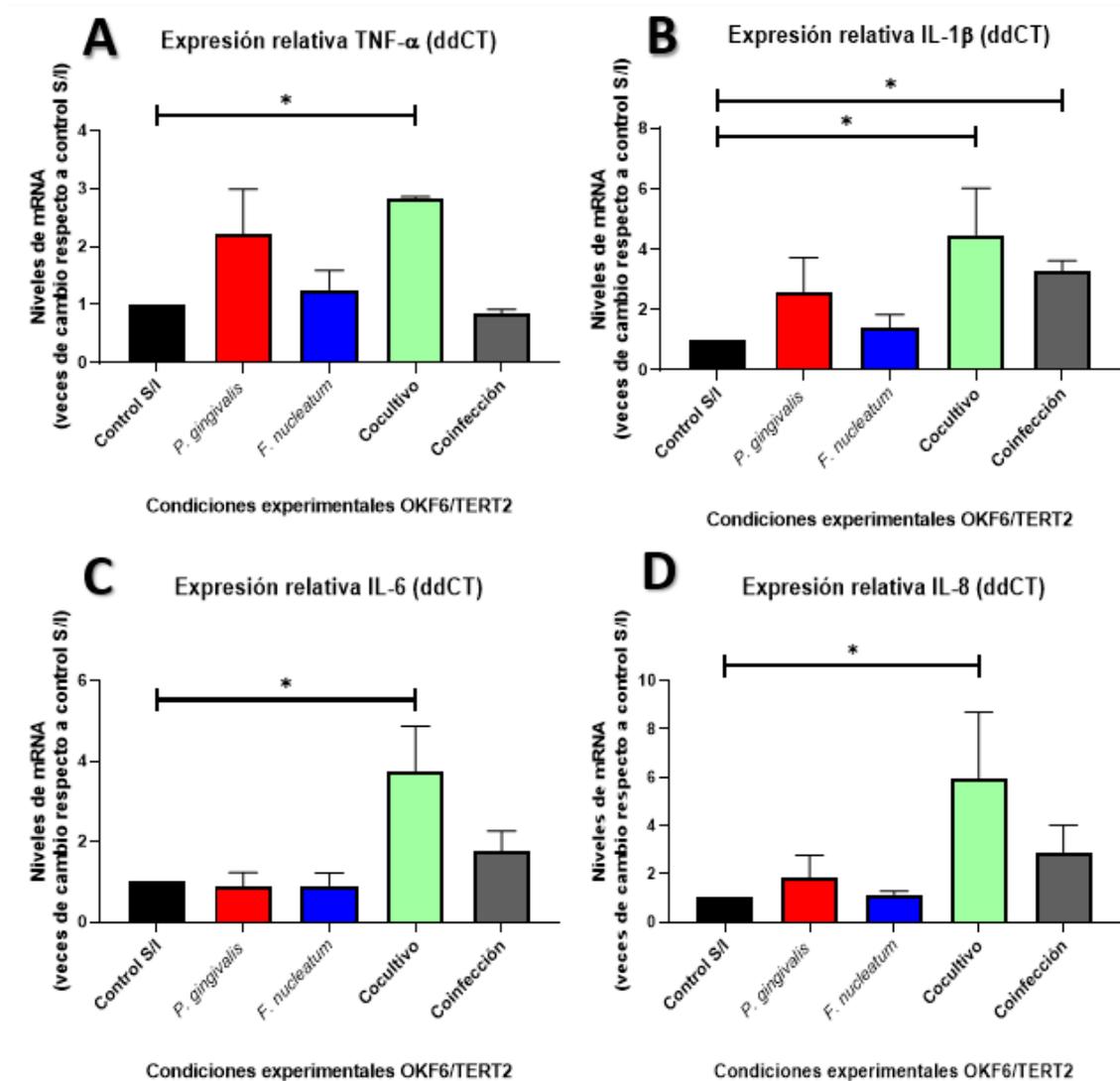


Figura 7. Efectos del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sobre la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. Se presentan las veces de cambio obtenidas respecto al control sin infectar (control S/I) en la expresión génica relativa de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2. Los niveles de mRNA fueron normalizados a un valor

de 1 para el control sin infectar (S/I) como se observa en el eje Y, utilizando el método delta-delta CT. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=4$.

5.2 Evaluación de la activación de la vía NF- κ B en células OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

El factor de transcripción NF- κ B es una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción diméricos y consiste en 5 subunidades: p50, p52, p65 (conocida también como Rel-A, Rel-B y c-Rel), sin embargo, solo p65, Rel-B y Rel-c poseen los dominios necesarios para la activación y transcripción de los genes dependientes de la actividad de NF- κ B [45]. Dentro de sus genes blanco se encuentran las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, entre otras [43]. Además, la activación de NF- κ B se considera como un evento clave en la respuesta inflamatoria y común en procesos carcinogénicos debido a que esta proteína está relacionada a procesos como la inhibición de la apoptosis y la promoción de la proliferación celular, los cuales son conocidos marcadores (o *Hallmarks*) del cáncer [33]. Ha sido evidenciado en la bibliografía que tanto *P. gingivalis* como *F. nucleatum* son capaces de gatillar fuertes respuestas inflamatorias vía la activación de este factor de transcripción [43,44, 62, 63]. Debido a lo expuesto anteriormente, se realizaron experimentos de Western blot con el fin de determinar los cambios producidos en los niveles totales de NF- κ B al infectar con los monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, el cocultivo y la coinfección de ambas bacterias en GECs. Para realizar el experimento mencionado, se procedió acorde a lo estipulado en el apartado 4.9 de los materiales y métodos. En la **Figura 8A y 8B** se observa que solo la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* generó un aumento en el número de píxeles cuantificados por densitometría, lo que se traduce en un incremento significativo en los niveles de la subunidad p65 de NF- κ B. Por otro lado, las monoinfecciones y la infección con el cocultivo de estas bacterias no lograron aumentar los niveles de dicha proteína.

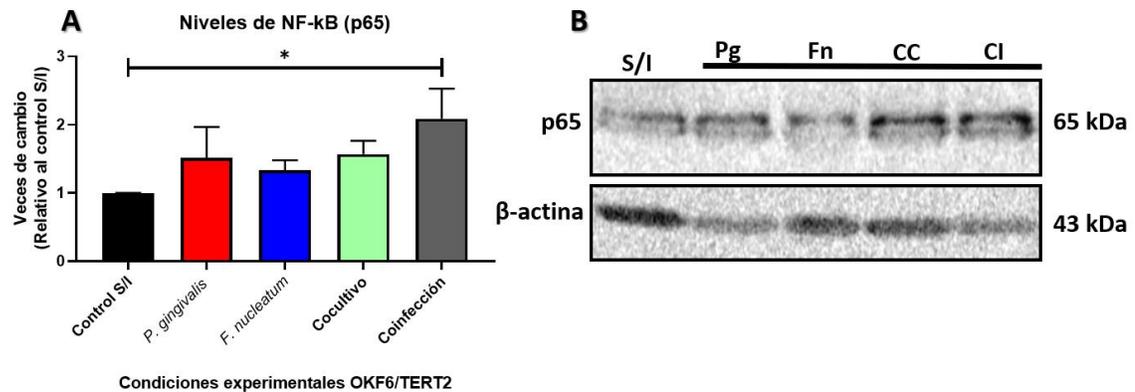


Figura 8. Análisis de los niveles de NF-kB tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. (A) La coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta los niveles de p65 en GECs, más no el cocultivo de ambas bacterias. (B) Blot representativo de los cambios en los niveles de p65 y β -actina en células OKF6/TERT2, donde se aprecia los niveles de NF-kB y β -actina de: el control sin infectar (control S/I), la infección con *P. gingivalis* (Pg), *F. nucleatum* (Fn), el cocultivo de ambas bacterias (CC) y la coinfección (CI). Los niveles proteicos fueron normalizados con aquellos de β -actina. Las veces de cambio fueron normalizadas a 1 acorde a lo observado en el eje Y del gráfico. El análisis de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n = 4$.

A pesar de que los niveles totales de p65 varían solo al estimular con la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, se ha reportado que puede haber cambios en la activación de NF-kB aun así no haya cambios en los niveles de la proteína [95]. Debido a lo anterior, se determinó si el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* logra generar la activación del factor de transcripción NF-kB, con el objetivo de vincularla con los cambios observados previamente respecto a la expresión de las citoquinas proinflamatorias. Este factor se encuentra normalmente secuestrado en el citoplasma gracias a la unión con su inhibidor I κ B, siendo incapaz de unirse a promotores de sus secuencias blanco, sin embargo, cuando se fosforila su inhibidor, este es degradado, lo que tiene como consecuencia la liberación y posterior fosforilación y activación de NF-kB, el cual transloca al núcleo celular, promoviendo así la expresión génica de sus genes blanco [91].

El análisis de los niveles de NF- κ B fosforilado (pNF- κ B) se realizó mediante Western blot. En las **Figuras 9A y 9B** se observa que ninguna de las condiciones experimentales utilizadas modifica significativamente número de píxeles obtenidos para pNF- κ B o NF- κ B en comparación al control S/I. Para analizar el nivel de fosforilación de NF- κ B, se calculó una razón entre los valores obtenidos mediante densitometría para pNF- κ B y NF- κ B, observándose que no hay cambios estadísticamente significativos en ninguna de las condiciones experimentales analizadas. Por ende, se determinó que la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en células OKF6/TERT2 no genera cambios en los niveles de fosforilación del residuo Ser536 de la subunidad p65 de esta proteína de NF- κ B.

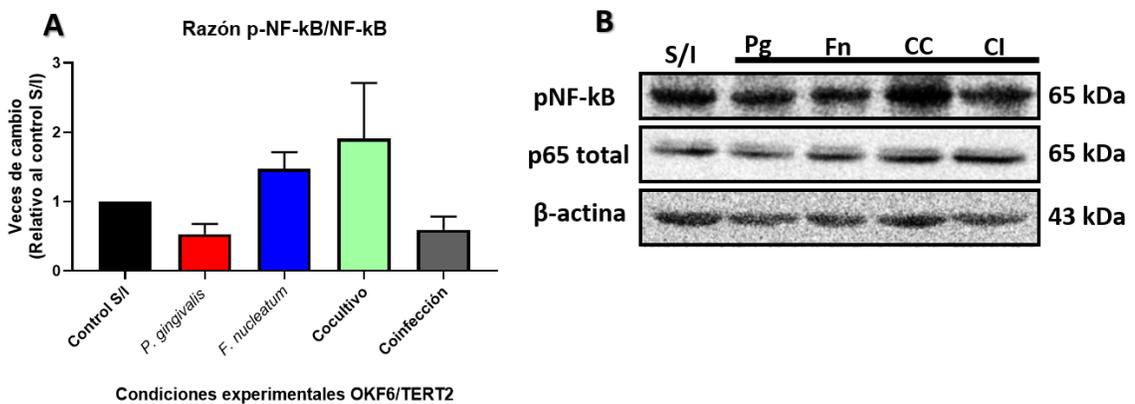


Figura 9. Efectos del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sobre los niveles de pNF- κ B.

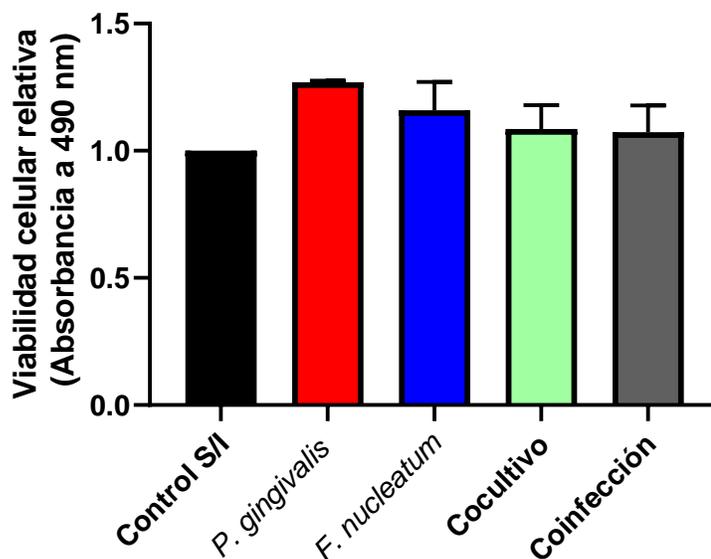
(A) Cuantificación densitométrica de los Western blots obtenidos contra pNF- κ B en células OKF6/TERT2, observándose que no hay cambios en los niveles de fosforilación de NF- κ B. (B) Blot representativo reflejando los cambios en los niveles de pNF- κ B, NF- κ B total y β -actina realizado en células OKF6/TERT2, donde se aprecia: el control sin infectar (control S/I), la infección con *P. gingivalis* (Pg), *F. nucleatum* (Fn), el cocultivo de ambas bacterias (CC) y la coinfección (CI). Los niveles proteicos fueron normalizados con aquellos de β -actina. Las veces de cambio fueron normalizadas a 1 acorde a lo observado en el eje Y del gráfico. El análisis de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$.

5.3 Determinación del efecto sobre la viabilidad celular de cultivos OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

En base a lo reportado en la **Figura 7**, **Figura 8** y **Figura 9** y tomando en consideración que las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 se relacionan con ciertos procesos celulares de carácter oncogénicos como la invasión, migración y proliferación celular [82, 83, 84], además del rol que juega el factor de transcripción NF-kB en la inhibición de la apoptosis y la promoción de la proliferación celular [33], se procedió a determinar el efecto que las monoinfecciones, la infección con el cocultivo y la coinfección con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* generan sobre la viabilidad celular de cultivos de GECs. Para esto, se realizó el ensayo de MTS el cual consiste en el uso de una sal denominada 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio que es reducida por la enzima deshidrogenasa mitocondrial, dando como producto una molécula llamada formazán (de color rojizo) que se puede cuantificar mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 492 nm [87]. Esta sal será capaz de penetrar la membrana celular y ser reducida a nivel mitocondrial, por ende, a mayor número de células viables mayor coloración roja existirá [87,88]. Para realizar este ensayo se sembraron 25.000 células OKF6/TERT2 en una placa de 96 pocillos en triplicado técnico y se estimularon con monoinfecciones de *P. gingivalis* W50, *F. nucleatum* ATCC 10953, el cocultivo (previamente incubado por 24h) y la coinfección de ambas, siempre considerando una MOI = 100. Transcurridas las 24h del ensayo de protección con gentamicina y metronidazol, se agregó el MTS y se incubó 1h a 37°C y 5% de CO₂, para luego medir la absorbancia a 490 nm.

En la **Figura 10** se puede apreciar que ninguna de las condiciones experimentales utilizadas afectó de manera significativa la absorbancia evaluada a 490 nm en comparación al control S/I, lo que sugiere que la infección con los monocultivos, el cocultivo y coinfección *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, no afectan la viabilidad celular respecto al control sin infectar (S/I), lo que demuestra que las condiciones experimentales evaluadas no son citotóxicas para cultivos de células OKF6/TERT2.

Ensayo MTS de viabilidad celular



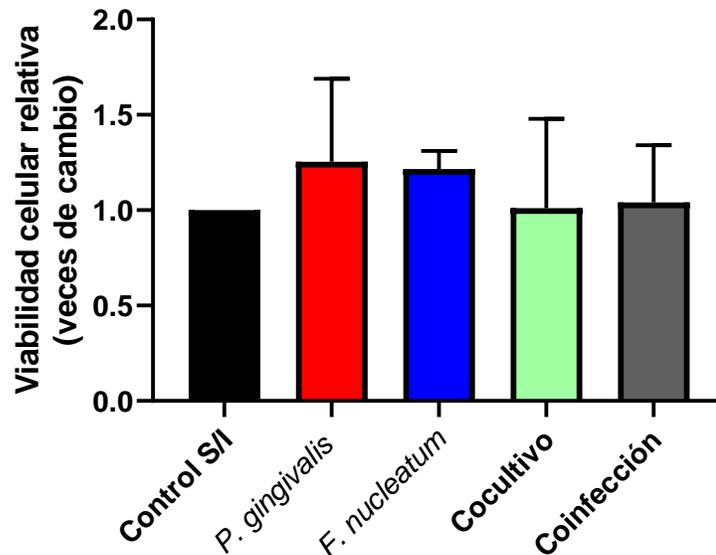
Condiciones experimentales OKF6/TERT2

Figura 10. Evaluación de la viabilidad celular tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Se observan los cambios en viabilidad celular de células OKF6/TERT2 tras ser infectadas con monocultivos, cocultivo y coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. La viabilidad celular de cada condición experimental fue comparada con la del control S/I. Los valores de absorbancia obtenidos a 490 nm fueron normalizados a un valor de 1 y expresados en veces de cambio respecto al control. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$.

Para complementar los resultados obtenidos en los ensayos MTS de viabilidad celular, se realizaron experimentos con azul de tripán. Este consiste en un ensayo colorimétrico que tiñe de color azul las células muertas (no viables), es decir, el compuesto azul de tripán es capaz de ingresar a las células solo si la integridad de su membrana se ha perdido, lo cual es característico de los procesos de muerte celular [114]. Para esto, se sembraron 300.000 células OKF6/TERT2 en una placa de 6 pocillos y posteriormente se infectaron con monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, el cocultivo y coinfección de ambas. Como se puede observar en los resultados preliminares expuestos en la **Figura 11**, ninguna de las condiciones experimentales compromete la viabilidad celular, es más,

el comportamiento de los datos es similar a aquel expuesto previamente en los resultados obtenidos a partir del ensayo MTS (**Figura 10**), lo que podría sugerir que las condiciones experimentales utilizadas no son citotóxicas.

Ensayo de azul de tripán de viabilidad celular



Condiciones experimentales OKF6/TERT2

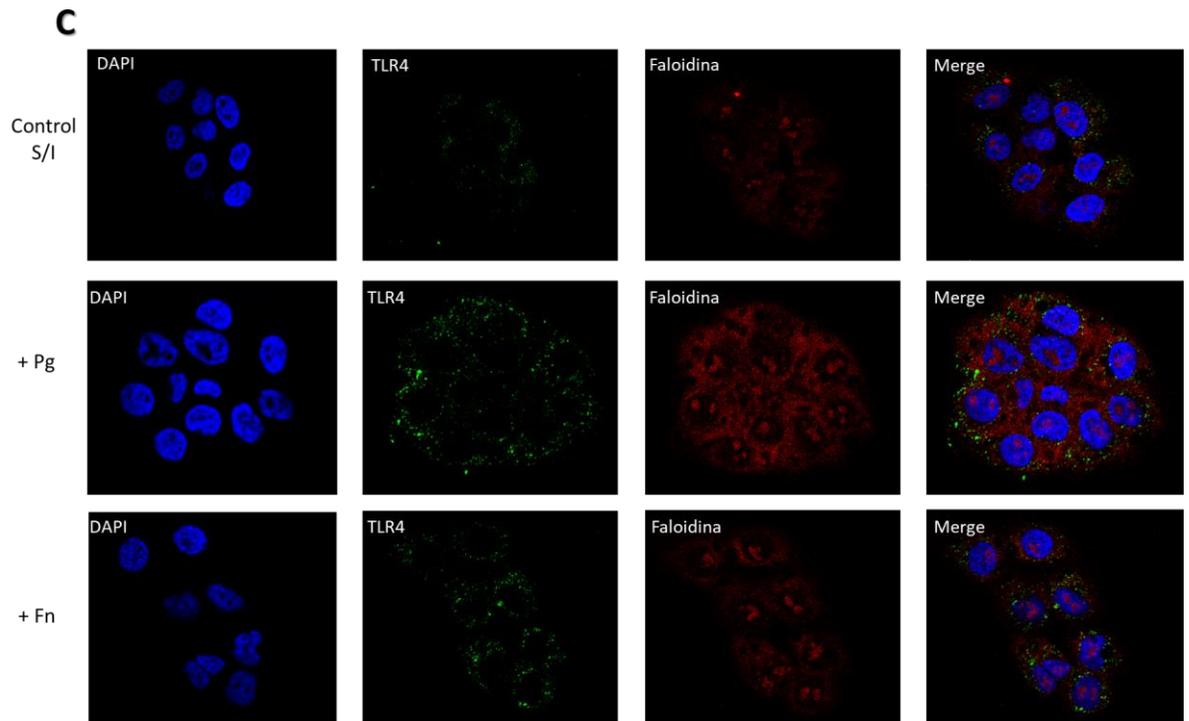
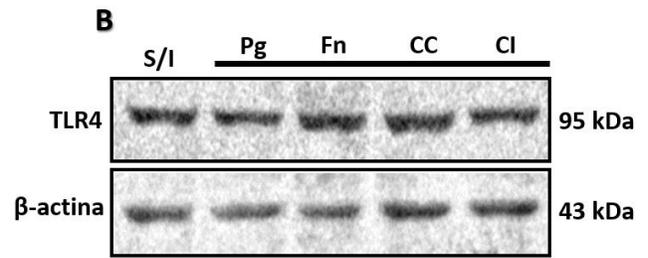
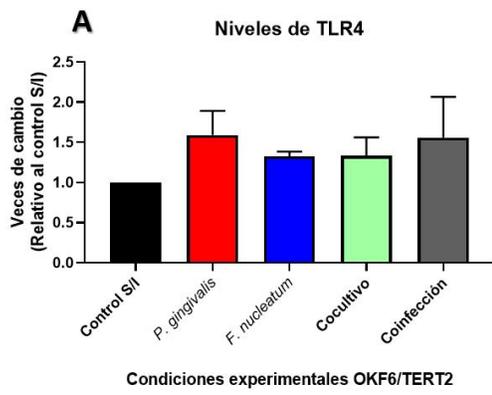
Figura 11. Resultados preliminares de los ensayos de azul de tripán. Se observan los cambios en viabilidad celular de células OKF6/TERT2 tras ser infectadas con monocultivos, cocultivo y coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. La viabilidad celular de cada condición tratada fue comparada con la del control sin infectar (S/I). Los valores obtenidos a partir del conteo de células viables fueron normalizados a 1 y expresados en veces de cambio respecto al control. n=2.

5.4 Determinación de la contribución del receptor TLR4 en la expresión de citoquinas proinflamatorias, activación de la vía de NF- κ B y en la viabilidad celular de células OKF6/TERT2 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

Se ha reportado que las células epiteliales gingivales expresan una gran cantidad basal de TLR4 [89] y que, además, las monoinfecciones con *P. gingivalis* o *F. nucleatum* son

capaces de gatillar diversas respuestas celulares vía la activación de este receptor, entre las cuales se encuentran la liberación de mediadores inflamatorios, debido a la activación de NF- κ B, y la promoción de la proliferación celular [36, 43, 44, 63]. Para determinar si la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* provoca cambios en los niveles y/o distribución celular del receptor TLR4, se realizaron experimentos de Western blot para medir los niveles de esta proteína y ensayos de inmunofluorescencia (IFI) para evaluar su distribución celular en GECs. Ha sido ampliamente demostrado en la bibliografía que el receptor TLR4 se expresa basalmente en células epiteliales orales humanas y que, además este se ubica principalmente en la superficie celular y en bajo porcentaje en el medio intracelular [89, 96].

En la **Figura 12A y 12B** se puede apreciar que la infección de cultivos celulares OKF6/TERT2 con *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, el cocultivo y la coinfección de ambas bacterias, no generó cambios en la cuantificación de los pixeles de las bandas proteicas obtenidas, lo que se tradujo en que ninguna de las condiciones experimentales utilizadas produjo cambios en los niveles de TLR4. Con el fin de complementar los datos obtenidos, se realizó una IFI para visualizar la distribución celular del receptor tras infectar con las condiciones celulares estipuladas. Para ello, se utilizó el protocolo estipulado en el apartado 4.12 de la sección de metodología de este trabajo y se marcó el receptor TLR4 con anti-TLR4 ligado a la sonda fluorescente Alexa Fluor 488 (exhibida en la imagen de color verde) y, adicionalmente, se utilizó la sonda Faloidina Alexa Fluor 633 (marca de color rojo) para marcar la actina F del citoesqueleto. En la **Figura 12C** se observa que la marca fluorescente verde se distribuye principalmente por la periferia celular, lejos del núcleo, al estimular los cultivos celulares con las condiciones experimentales, lo cual se condice con lo estipulado en la bibliografía [96]. Lo anterior indica que la distribución celular del receptor TLR4 no varía tras infectar con los monocultivos, el cocultivo y la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en células OKF6/TERT2.



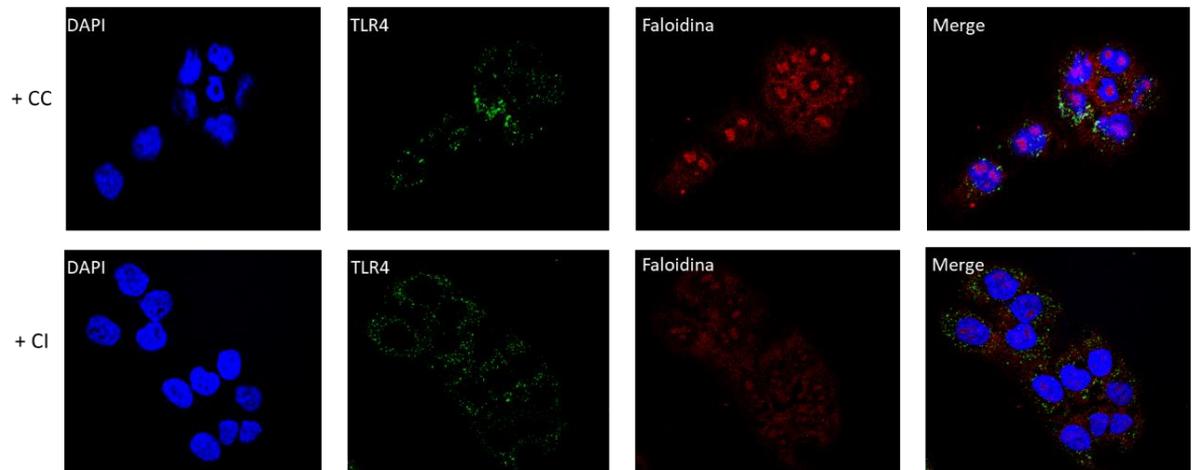


Figura 12. Niveles y distribución celular del receptor TLR4 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. (A) Análisis densitométrico del Western blot muestra que la infección con el monocultivo de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, el cocultivo y la coinfección de ambos microorganismos no generan cambios en los niveles de TLR4. (B) Blot representativo de los niveles de TLR4 y β -actina realizado en células OKF6/TERT2, donde se aprecia: el control sin infectar (control S/I), la infección con *P. gingivalis* (Pg), *F. nucleatum* (Fn), el cocultivo de ambas bacterias (CC) y la coinfección (CI). Los niveles proteicos fueron normalizados con aquellos de β -actina. Las veces de cambio fueron normalizadas a 1 acorde a lo observado en el eje Y del gráfico. El análisis de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=5$. (C) Las células OKF6/TERT2 fueron marcadas con anti-TLR4 (1:200) (Santa Cruz Biotechnologies) ligado a la sonda fluorescente Alexa Fluor 488. Además, se marcó el citoesqueleto celular con Faloidina Alexa Fluor 633 y se evaluó la distribución celular del receptor TLR4 mediante inmunofluorescencia. Se exponen las imágenes representativas de la microscopía confocal realizada, donde se aprecia: el control sin infectar (control S/I), la infección con *P. gingivalis* (+Pg), *F. nucleatum* (+Fn), el cocultivo de ambas bacterias (+CC) y la coinfección (+CI). Escala de tamaños de 100 micrones (μm).

En base a lo expuesto en la **Figura 12**, fue posible determinar que no hay cambios ni en los niveles de TLR4 ni en su distribución celular al estimular cultivos de células OKF6/TERT2 con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

No obstante, debido a que se ha comprobado que estas bacterias activan el receptor TLR4, gatillando así diversas respuestas celulares gracias, en parte, a la activación de

NF- κ B y la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [36, 43, 44, 47, 63], y tomando en cuenta los resultados obtenidos respecto a la expresión de los mediadores inflamatorios mencionados anteriormente (**Figura 7**), no es posible, entonces, descartar la probable participación de TLR4 en la activación de NF- κ B, la expresión de citoquinas proinflamatorias y la viabilidad celular en células epiteliales gingivales. Además, en un contexto de periodontitis, el factor de transcripción NF- κ B promovería la expresión génica de ciertas citoquinas proinflamatorias que tienen relación con la destrucción del periodonto y la subsecuente progresión de la periodontitis, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [43, 79]. Por ende, con el fin de determinar si efectivamente el receptor TLR4 contribuye en los cambios observados respecto a la liberación de citoquinas proinflamatorias y a los niveles de p65, se realizó un *knockdown* de dicho receptor. Para lograr el silenciamiento del TLR4, se realizó una transducción de las células OKF6/TERT2 con un plasmidio conteniendo una secuencia codificante para un ARN de horquilla pequeña (*small hairpin* RNA (shRNA) acorde a lo descrito en el apartado 4.6.1 de la metodología de este trabajo.

Para confirmar el nivel de silenciamiento del gen codificante del receptor TLR4, se midió la cantidad de proteína total, mediante Western blot, en las células silenciadas, el cual muestra una disminución en la expresión de TLR4 de un 67% (Soto, e al, 2022; Revisar material suplementario). Al momento de infectar estas células silenciadas (denominadas como cultivos shTLR4) y analizar los niveles del receptor TLR4, se observó que la infección con el monocultivo de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, el cocultivo y coinfección de ambos microorganismos no produjo cambios en el número de píxeles obtenidos de las bandas proteicas de este receptor, es decir, las condiciones experimentales utilizadas no generaron cambios en los niveles de TLR4 en comparación al control sin infectar de las células shTLR4 (control S/I shTLR4) (**Figura 13A y 13B**). Como parámetro de comparación de los niveles basales del receptor TLR4, se utilizaron extractos proteicos de cultivos de células OKF6/TERT2 sin transducir (TLR4 +), los cuales no fueron infectados. Por otro lado, en las **Figuras 13C y 13D** es posible apreciar que el número de píxeles obtenidos de las bandas proteicas de p65 no variaron tras infectar con el monocultivo, cocultivo y coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, lo cual demuestra que los niveles de p65 no cambian respecto al control S/I shTLR4 tras estimular con las

condiciones experimentales mencionadas previamente. Es más, ninguna de dichas condiciones logró restablecer los niveles de p65 al nivel de las células normales sin transducir (TLR4 +).

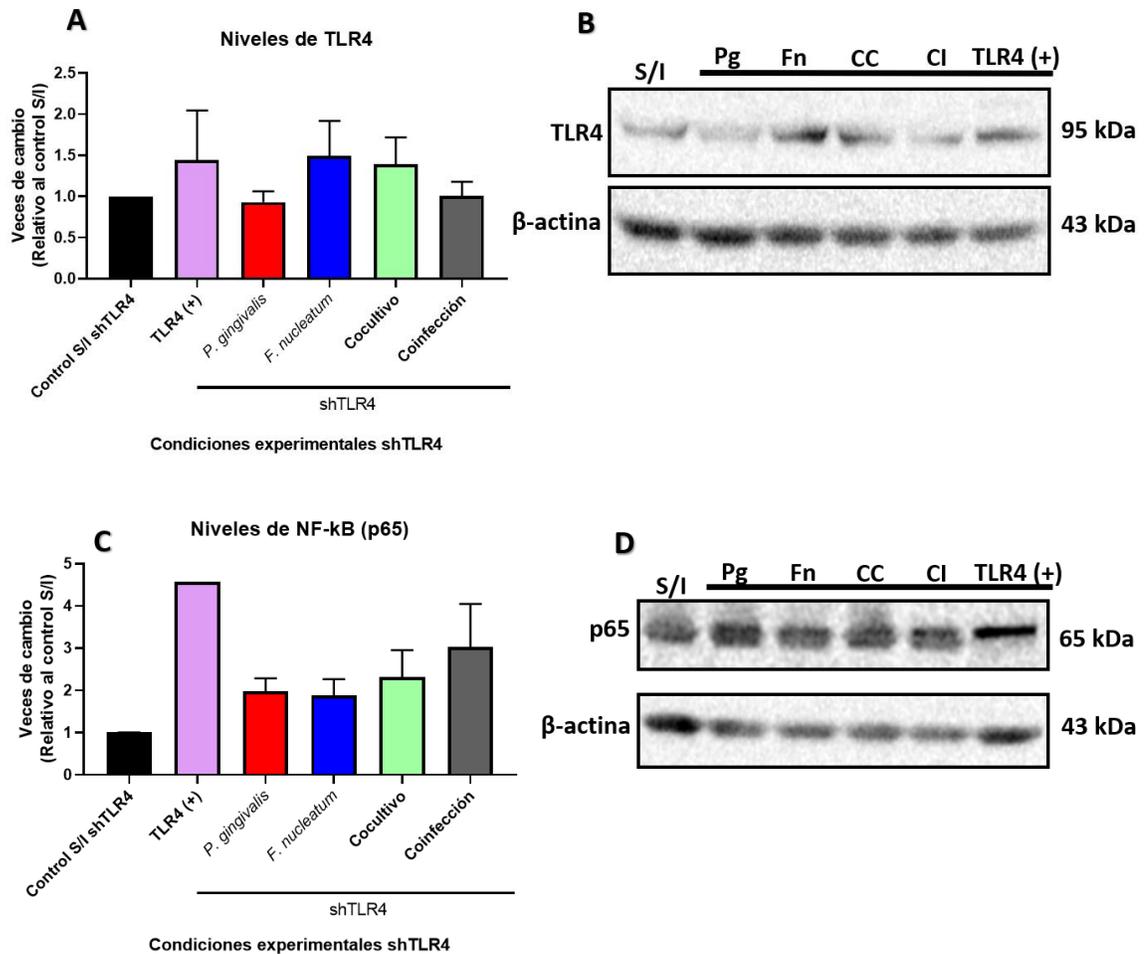


Figura 13. Niveles de TLR4 y p65 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en cultivos celulares shTLR4 (A) Se exhibe la cuantificación mediante densitometría de los Western blots obtenidos contra TLR4 en células shTLR4, donde no se observan cambios estadísticamente significativos en comparación al control S/I shTLR4. (B) Blot representativo de los niveles de TLR4 y β-actina realizado en células shTLR4, en el cual se aprecia: el control sin infectar (S/I shTLR4), el control sin transducir (TLR4 +), la infección con *P. gingivalis* (Pg), *F. nucleatum* (Fn), el cocultivo de ambas bacterias (CC) y la coinfección (CI). (C) Es posible observar la cuantificación mediante densitometría de los Western blots obtenidos contra NF-κB, subunidad p65, en células shTLR4, en la cual no se reportan cambios estadísticamente significativos

respecto al control sin infectar shTLR4. (D) Blot representativo reflejando los cambios en los niveles de p65 y β -actina realizado en células shTLR4, en el cual se aprecia: el control sin infectar (S/I shTLR4), el control sin transducir (TLR4 +), la infección con *P. gingivalis* (Pg), *F. nucleatum* (Fn), el cocultivo de ambas bacterias (CC) y la coinfección (CI). Los niveles proteicos fueron normalizados con aquellos de β -actina. Las veces de cambio fueron normalizadas a 1 acorde a lo observado en el eje Y del gráfico. El análisis de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$.

Para determinar la contribución del receptor TLR4 en la viabilidad celular de cultivos shTLR4 tras infectar con los monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, el cocultivo y la coinfección de ambas bacterias, se realizó un ensayo de MTS de viabilidad celular. Para esto, se sembraron 25.000 células shTLR4 en una placa de 96 pocillos en triplicado técnico y se estimularon con monoinfecciones de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, el cocultivo y la coinfección de ambas, siempre considerando una MOI = 100 final. Transcurridas las 24 h post infección, se agregó el MTS y se incubó 1 h a 37°C y 5% de CO₂, para luego medir la absorbancia a 490 nm. En la **Figura 14** se puede observar que la absorbancia evaluada a 490 nm no varió tras estimular con las condiciones experimentales descritas, lo que sugiere que, al realizar un *knockdown* del receptor TLR4, no se producen cambios en la viabilidad celular de cultivos OKF6/TERT2 tras infectar con los monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, el cocultivo y la coinfección de ambas bacterias.

Ensayo MTS de viabilidad celular

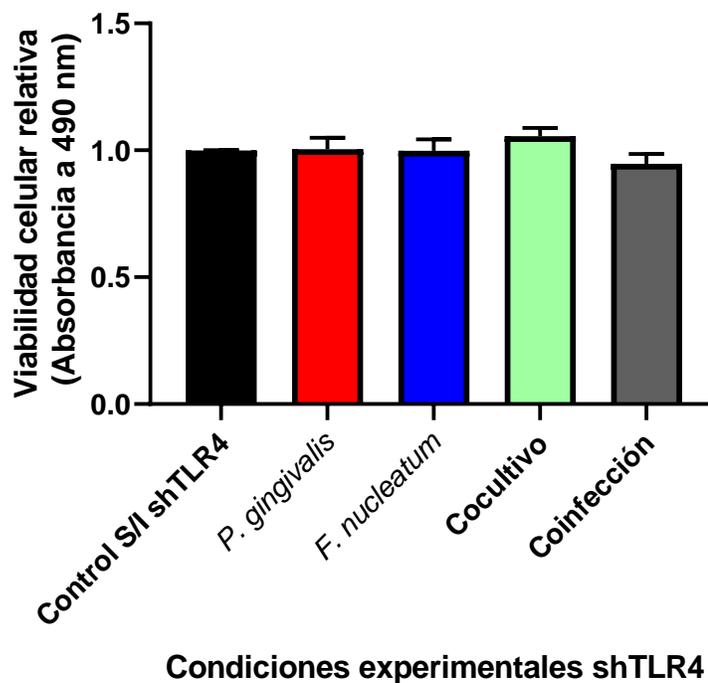


Figura 14. Viabilidad celular de cultivos shTLR4 tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Se aprecian los datos de absorbancia obtenidos a 490 nm tras infectar con el monocultivo, cocultivo y coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, determinándose que no hay cambios en la viabilidad celular de células shTLR4. La viabilidad celular de cada condición experimental fue comparada con la del control S/I shTLR4. Los valores de absorbancia a 490 nm obtenidos fueron normalizados a un valor de 1 y expresados en veces de cambio respecto al control. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=4$.

Luego, como control, se realizó la transducción de un plasmidio codificante de un RNA de horquilla pequeña de secuencia aleatoria (shRNA scramble o shSCR), el cual no hibridará con ningún mRNA, permitiendo confirmar que el eventual efecto observado es producto de las infecciones bacterianas. En virtud de lo anterior, se procedió a evaluar la viabilidad celular en cultivos que fueron transducidos con un plasmidio codificante de una secuencia shScramble. Para ello, se realizó la infección de dichas células con monocultivos de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, y el cocultivo y coinfección de ambas. En la **Figura 15**, se exponen los resultados preliminares del ensayo MTS en cultivos shScramble, donde se aprecia que el comportamiento de los datos obtenidos es

diferente a aquel observado en los experimentos realizados en cultivos celulares sin transducir (**Figura 10**). Sin embargo, se requieren más ensayos para confirmar esta tendencia.

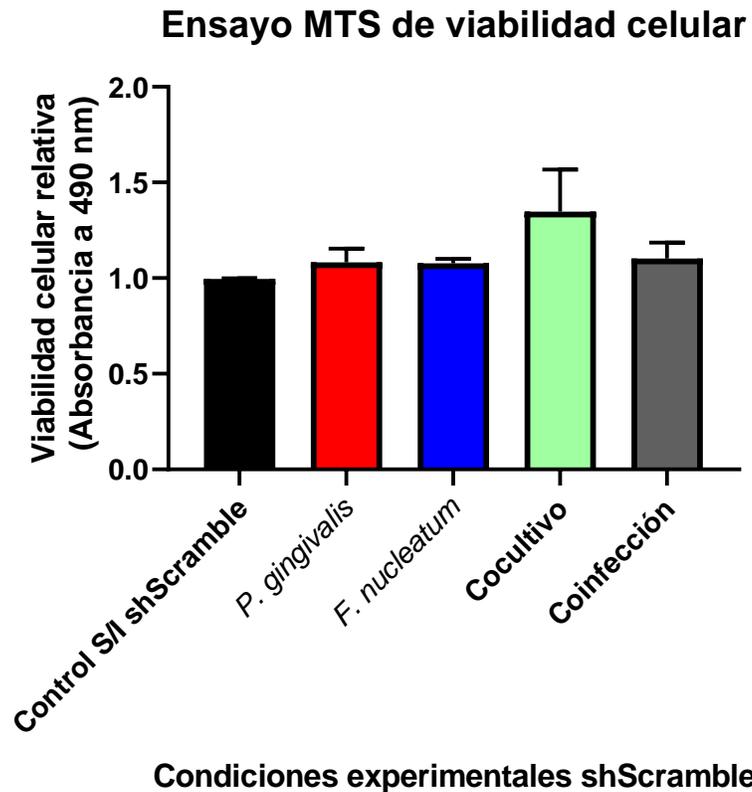


Figura 15. Resultados preliminares del ensayo MTS de viabilidad celular de cultivos shScramble. Se observan los datos de absorbancia obtenidos a 490 nm tras infectar cultivos celulares shScramble con los monocultivos, el cocultivo y la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. La viabilidad celular de cada condición experimental fue comparada con la del control S/I shScramble. Los valores de absorbancia a 490 nm obtenidos fueron normalizados a un valor de 1 y expresados en veces de cambio respecto al control. n=2.

A continuación, con el objetivo de determinar la contribución del receptor TLR4 en la fosforilación y posterior translocación al núcleo celular de NF- κ B, además de su contribución en la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, se realizaron experimentos de Western blot y qPCR en las células shTLR4. En primera instancia, se expone el resultado preliminar del Western blot para pNF- κ B (**Figura 16A**

y **16B**), en donde se puede apreciar que ninguna de las condiciones experimentales utilizadas logra restablecer la cantidad de pNF-kB a los niveles del control de las células sin transducir (TLR4⁺), sin embargo, se requiere un mayor número de replicados biológicos para realizar la estadística correspondiente.

Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos de qPCR de las células shTLR4 previamente infectadas, lo cual se realizó acorde a lo estipulado en el apartado 4.10 de los materiales y métodos de este trabajo de tesis. En la **Figura 16C, 16D, 16E y 16F** se aprecian las veces de cambio obtenidas respecto al control S/I de la expresión génica relativa de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, respectivamente, en los cultivos shTLR4 tras ser infectados. En la **Figura 16C** se desprende que el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta los niveles de mRNA de TNF- α , lo cual demuestra que la infección con el cocultivo de estas bacterias incrementa la expresión génica de TNF- α de manera significativa y al mismo nivel de lo observado previamente en células OKF6/TERT2 (**Figura 7A**). Por otro lado, en la **Figura 16D** se observa que la infección con el cocultivo y el monocultivo de *P. gingivalis* incrementan los niveles de mRNA de IL-1 β de manera estadísticamente significativa, lo cual demuestra que la infección con el cocultivo y el monocultivo de *P. gingivalis* aumenta la expresión génica de IL-1 β significativamente respecto al control S/I shTLR4, sin embargo, no al nivel de lo observado previamente en las células sin transducir (**Figura 7B**). Al apreciar la **Figura 16E** no se observan cambios en los niveles de mRNA de IL-6 tras estimular las células shTLR4 con las condiciones experimentales descritas, a diferencia de lo observado tras infectar las células OKF6/TERT2 (**Figura 7C**). En la **Figura 16F** se observa que solo la infección con el cocultivo aumenta los niveles de IL-8 de manera significativa y sinérgica, coincidiendo con lo observado al tratar las células OKF6/TERT2 y analizar la citoquina en cuestión (**Figura 7D**). Por ende, a partir de la **Figura 16**, es posible concluir que la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta de manera significativa la expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-8 en cultivos celulares silenciadas contra TLR4.

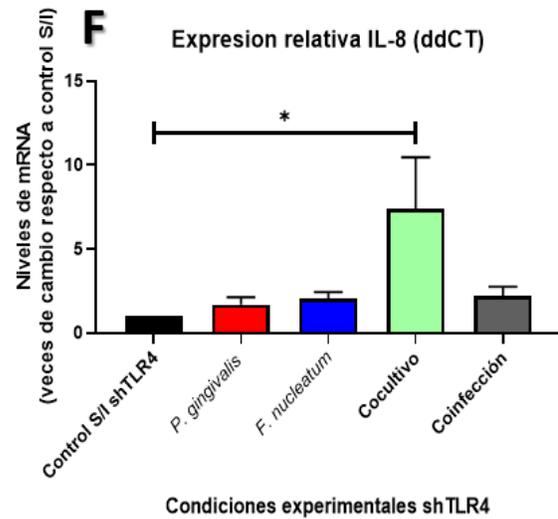
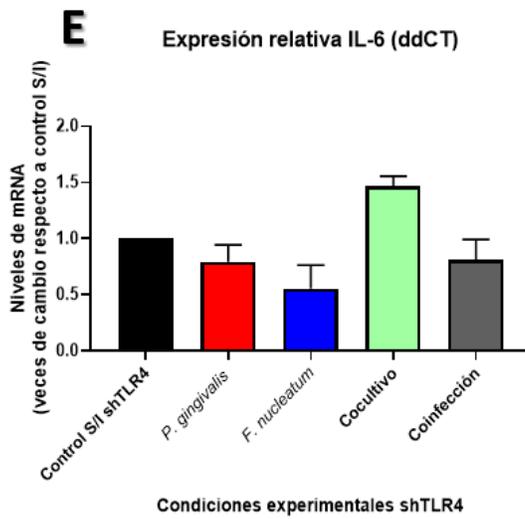
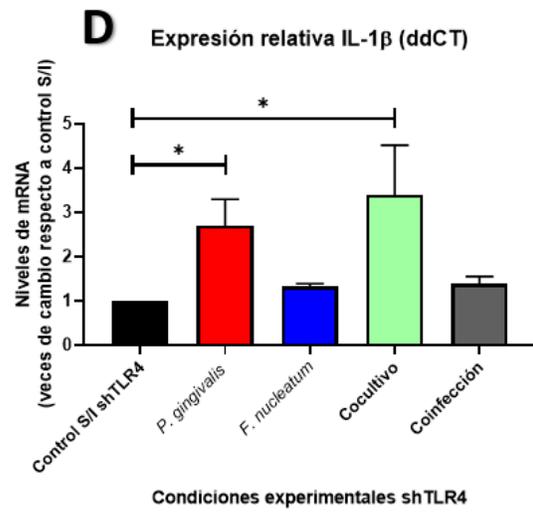
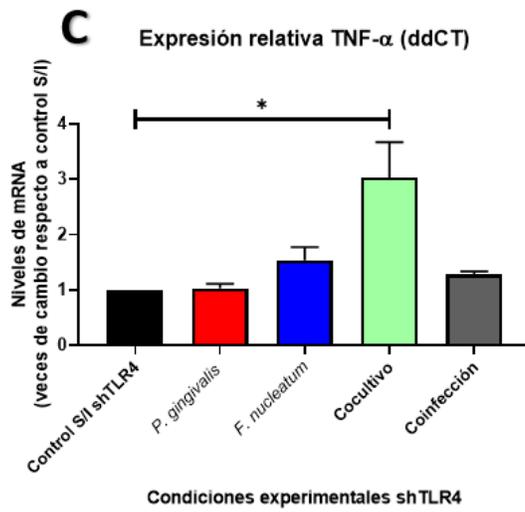
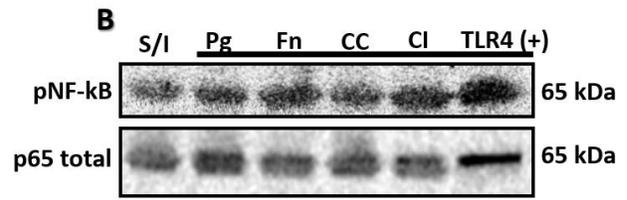
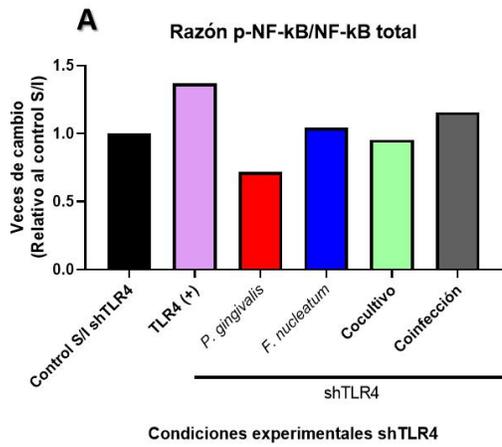


Figura 16. Efectos del *knockdown* de TLR4 sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias tras la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. (A) Cuantificación densitométrica del Western blot obtenido contra pNF-kB en células shTLR4 como resultado preliminar. (B) Blot representativo reflejando los cambios en los niveles de pNF-kB y NF-kB total realizado en células shTLR4, en el cual se aprecia: el control sin infectar (S/I shTLR4), el control sin transducir (TLR4⁺), la infección con *P. gingivalis* (Pg), *F. nucleatum* (Fn), el cocultivo de ambas bacterias (CC) y la coinfección (CI). Los niveles proteicos fueron normalizados con aquellos de β -actina. Las veces de cambio fueron normalizadas a 1 acorde a lo observado en el eje Y del gráfico. El análisis de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ. n=1. Respecto a las siguientes figuras, se exhiben las veces de cambio obtenidas respecto al control S/I shTLR4 en la expresión génica relativa de TNF- α (C), IL-1 β (D), IL-6 (E) e IL-8 (F) en células shTLR4. Los niveles de mRNA fueron normalizados a un valor de 1 para el control sin infectar (S/I) como se observa en el eje Y utilizando el método delta-delta CT. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. n=3.

Finalmente, se evaluó el perfil de expresión de las citoquinas proinflamatorias mencionadas anteriormente en cultivos de células OKF6/TERT2 silenciadas con una secuencia shScramble. En la **Figura 17A, 17B, 17C y 17D** se presentan los resultados preliminares obtenidos para las expresiones relativas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, respectivamente, todas expresadas como veces de cambio respecto al control S/I shScramble tras utilizar el método delta-delta CT. Todos estos datos preliminares se comportan de manera similar con aquellos datos obtenidos a partir de los cultivos de células TLR4⁺ sin transducir, sugiriendo que el silenciamiento de TLR4 no afectaría los niveles de mRNA de estas interleuquinas. Sin embargo, recomendamos realizar más replicados biológicos para así aplicar el test estadístico adecuado y obtener conclusiones más definitivas.

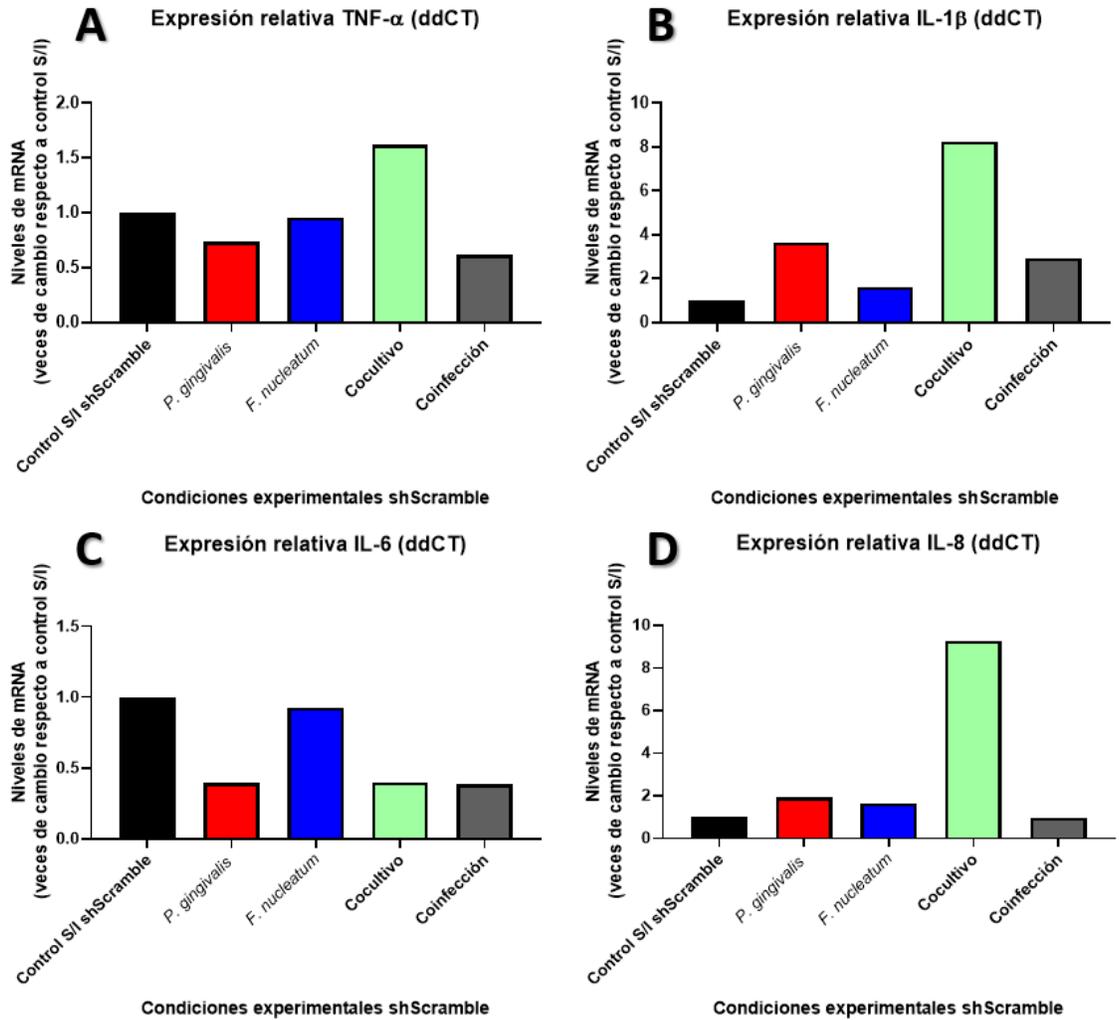


Figura 17. Resultados preliminares del qPCR de células shScramble. Se presentan las veces de cambio obtenidas respecto al control sin infectar (S/I shScramble) en la expresión génica relativa de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-8 (D) en cultivos OKF6/TERT2 que sufrieron la transducción con un plasmidio codificante de una secuencia shScramble. Los niveles de mRNA fueron normalizados a un valor de 1 para el control sin infectar como se observa en el eje Y utilizando el método delta-delta CT. n=1.

6. Discusión

La periodontitis se define actualmente como una patología caracterizada por una inflamación crónica del periodonto producto de la disbiosis del margen subgingival, es decir, el énfasis de la periodontitis son las múltiples interacciones microbianas que se dan entre las más de 700 especies que componen la biopelícula subgingival, las cuales promoverán la respuesta inflamatoria y la subsiguiente destrucción del tejido de soporte del diente [2, 12]. En este contexto, se ha descrito que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* pertenecen a la biopelícula subgingival y que ambas interactúan y juegan un rol en la etiología y progresión de la enfermedad periodontal [48, 54, 57].

Los modelos de cocultivos se utilizan como una estrategia para comprender las relaciones e interacciones entre las células procariontes y las orales eucariontes, con el fin de dilucidar la patogénesis de enfermedades orales y explorar nuevas terapias para tratarlas [76]. Además, estos modelos permiten estudiar las diferentes interacciones que ocurrirán durante un cocultivo, las cuales impactarán a una o ambas bacterias, por ejemplo, exacerbando la virulencia o produciendo cambios en la expresión de ciertos genes, como el gen codificante para la proteína relacionada al consumo de hemina o aquellos relacionados a la biosíntesis del lípido A del LPS [70, 71, 78]. En este contexto, en estudios de cocultivo de *P. gingivalis* y *T. denticola* se demostró que existe un traspaso de metabolitos entre ambas bacterias, donde *P. gingivalis* proveería del aminoácido glicina a *T. denticola*, promoviendo así el crecimiento y la colonización de esta última en la biopelícula subgingival [90]. Por otro lado, se ha descrito que *F. nucleatum* coagrega al ser cocultivada con diferentes especies de *Prevotella*, y que la interacción física entre ambas causaría un incremento en la capacidad de formación de biopelículas [94].

Debido a la importancia del papel de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en la periodontitis, numerosos investigadores han realizado diferentes cocultivos entre estas bacterias con el fin de determinar la naturaleza de sus interacciones y su efecto en términos de la relación patógeno hospedero. En modelos de comunidad entre *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *Streptococcus gordonii*, se observó que se producen cambios en la expresión de proteínas de *P. gingivalis* de tal manera de proveer de un soporte fisiológico

a esta bacteria [70,71]. Por otro lado, se realizó la extracción y purificación del LPS de *P. gingivalis* proveniente de un cocultivo junto con *F. nucleatum* y se estimularon cultivos *in vitro* de monocitos, observándose un aumento sinérgico en la expresión y secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-8, es decir, se reportan interacciones sinérgicas entre estas bacterias que se tradujo en una exacerbación de la virulencia de *P. gingivalis* [78].

Sin embargo, hasta la fecha no se reportan estudios sobre el cocultivo y la subsiguiente coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, lo cual es de suma importancia puesto que se ha demostrado sinergia en términos de la interacción entre ambas bacterias [78], de la interacción de ellas en modelos de periodontitis [74] y en modelos de cáncer oral [75]. Por ende, proponemos este modelo de cocultivo y posterior coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* como una válida aproximación para elucidar, comprender y caracterizar las interacciones patógeno-hospedero que ocurren en la cavidad oral en un contexto de periodontitis, dando énfasis en patógenos claves que jugarían un rol clave previo y durante la disbiosis característica de esta enfermedad.

En primer lugar, se procedió a estandarizar el cocultivo entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* con la finalidad de determinar si la sinergia observada en bibliografía en un contexto de periodontitis se replicaba en inflamación y así, vincularla con marcadores característicos de tumorigénesis oral. De esto fue posible observar que ambas bacterias logran crecer en un medio líquido previamente estandarizado compuesto de BHI, hemina, menadiona y cisteína, lo cual se correlaciona con lo descrito en la bibliografía. En dichos estudios, *P. gingivalis* y *F. nucleatum* eran capaces de crecer en un mismo medio de cultivo siempre y cuando se cumplieran las condiciones de anaerobiosis estricta y la suplementación adecuada con hemina y menadiona [77, 78]. Sin embargo, en ellos no se especifica la marcada diferencia en el tiempo que cada microorganismo demora en llegar a su fase exponencial. Para abordar lo anterior, se procedió a determinar las curvas de crecimiento de ambos microorganismos y en ellas es posible observar que *F. nucleatum* alcanza su fase exponencial en menos tiempo que *P. gingivalis*, lo que se explica -en parte- por el tiempo de generación de las cepas utilizadas en este estudio, es decir, el tiempo que demora una población bacteriana en duplicarse. Acorde a lo reportado en la bibliografía, la cepa de *P. gingivalis* W50 posee un tiempo de generación aproximado de 8,23 h, mientras que la cepa de *F. nucleatum* ATCC 10953 se caracteriza

por tener uno de 3 h aproximadamente [102, 103]. Por ende, es lógico pensar que a medida que transcurre el tiempo de medición de la curva de crecimiento de cada microorganismo, habrá un mayor número de bacterias por mL de *F. nucleatum* que de *P. gingivalis*, donde la primera mencionada alcanzará más rápido la fase estacionaria de crecimiento.

La dificultad de estandarizar el cocultivo a una razón aproximada de 1:1 de estas bacterias radicaba en la gran diferencia que poseen en términos de velocidad de crecimiento. Tras considerar la velocidad a la que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* alcanzan la fase exponencial y, tomando en cuenta lo determinado a partir de la ecuación de la recta de sus respectivas curvas, se obtuvo un cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* que tras 24 h de incubación a 37°C y anaerobiosis se encontraban ambas en una razón de 1:1,3, respectivamente. El hecho de que hubiese una mayor cantidad de *F. nucleatum* que de *P. gingivalis* al ser cocultivadas acorde a las condiciones previamente descritas era de esperarse. Lo anterior se debe principalmente a que la fase exponencial de crecimiento de *F. nucleatum* y su tiempo de generación [103] son más rápidos que aquellos de *P. gingivalis* [102].

Mediante estudios de extracción de DNA a partir de muestras clínicas de pacientes afectados por periodontitis y de sujetos sanos, y su posterior secuenciación del 16S rRNA, se estimó el porcentaje de abundancia relativa de las especies *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en la placa subgingival [2]. En esta investigación, se describe que, en salud, la abundancia relativa de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* es de 0,1% y 2%, respectiva y aproximadamente [2]. Sin embargo, tras perderse la homeostasis y ocurrir la transición de salud a periodontitis, la abundancia relativa de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta a 1% y 4%, aproximada y respectivamente [2]. Por lo tanto, en periodontitis, la razón clínica entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* es de 1:4, aproximadamente, lo cual difiere de la razón experimental obtenida entre estas bacterias en el cocultivo realizado en este trabajo de tesis. El cocultivo experimental entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* utilizado en este trabajo fue diseñado de tal forma que la razón entre ambas bacterias fuese similar ya que, de esta manera, se podría observar y analizar el efecto de ambas bacterias en conjunto, en vez de apreciar el efecto de una bacteria sobre la otra, lo cual probablemente ocurriría de utilizar la razón clínica descrita.

Al observarse una alícuota del cocultivo mediante SEM, fue posible determinar que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* interactúan físicamente, lo cual coincide con lo reportado previamente por diferentes investigadores. Se ha comprobado que *F. nucleatum* coagrega con un gran número de bacterias orales, destacando su afinidad por aquellas del género *Bacteroidetes*, como por ejemplo *P. gingivalis* [57]. Si se analizan los factores de virulencia de los microorganismos en cuestión que podrían contribuir a lo descrito anteriormente, se pueden destacar principalmente las múltiples adhesinas que presenta *F. nucleatum* como por ejemplo, la adhesina RadD, la cual permite que *F. nucleatum* interactúe con múltiples bacterias pertenecientes a la microbiota oral [54, 60]. Debido a esto, es lógico pensar que la estrecha interacción física entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sea probablemente debido a las adhesinas que presenta el último microorganismo mencionado y que, además, probablemente exista un aumento en la expresión de adhesinas por parte de ambas bacterias. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para corroborar esta última hipótesis, utilizando por ejemplo un estudio de proteómica.

Durante el cocultivo ocurrirán una serie de interacciones que impactarán a una o ambas bacterias. La naturaleza de las interacciones entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* se ha descrito como positiva en términos de exacerbación de la virulencia [78] o de soporte fisiológico para un rápido crecimiento [70,71]. Asimismo, ha sido reportado que la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* produce -de manera sinérgica- un agravamiento de los rasgos característicos de la periodontitis, como la resorción del hueso alveolar, la liberación de citoquinas proinflamatorias relacionadas a la destrucción del periodonto (como la IL-1 β y TNF- α) y la activación de vías de carácter oncogénico, como lo son la vía de NF-kB y STAT3 [74, 75]. Al analizar los datos obtenidos en la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, es posible observar que se produce un aumento en todas ellas tras infectar con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*. Es más, se genera un incremento sinérgico en la expresión de IL-6 e IL-8, lo que da cuenta que las interacciones que se producen durante el cocultivo incrementan la virulencia de una o ambas bacterias.

En reportes disponibles en la bibliografía, se ha comprobado que la coinfección crónica de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en epitelio lingual gatilla un aumento sinérgico en la

expresión de IL-6 [75], sin embargo, en este trabajo solo el cocultivo generó un aumento sinérgico de esta citoquina, lo cual probablemente se deba a la diferencia en el modelo experimental y el carácter agudo del estímulo utilizado en este trabajo de tesis. El resultado obtenido para la expresión de IL-6 no es extraño, puesto que se ha reportado que tanto *P. gingivalis* (vía su fimbria FimA y TLR4/NF-kB) como *F. nucleatum* (vía LPS, adhesina FadA y TLR4/NF-kB) promueven la expresión y secreción de esta citoquina [51, 62, 65]. Además -en un contexto de periodontitis- debido a que esta citoquina está relacionada con el proceso de resorción de hueso alveolar, es lógico pensar que su aumento sinérgico esté, probablemente, vinculado con una mayor disponibilidad de nutrientes para los microorganismos que componen la biopelícula subgingival. Es decir, la interacción entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* dentro de la biopelícula podría favorecer la disponibilidad de nutrientes para las demás bacterias que colonizan el margen subgingival al promover una mayor destrucción del periodonto [62, 79]. Adicionalmente, el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* incrementó la expresión de IL-1 β , lo cual es interesante puesto que se ha reportado que la IL-6 poseería un efecto sinérgico con la IL-1 β en términos de promover la resorción de hueso alveolar [84], por lo que ambas citoquinas se relacionarían con la patogénesis de la periodontitis y un agravamiento de sus signos clínicos [2]. Estos cambios concuerdan con lo descrito por el grupo de Lee y Baek, los cuales reportan la exacerbación de la virulencia de al menos una de las bacterias al ser cocultivadas [78]. Asimismo, la infección con el cocultivo aumentó los niveles de expresión de TNF- α aproximadamente 3 veces, lo cual se correlaciona con el hecho de que tanto *P. gingivalis* como *F. nucleatum* aumentan la expresión génica de esta citoquina en GECs y otros tipos celulares [36, 51, 61]. Se sabe que esta citoquina está fuertemente asociada a los procesos de migración celular, la resorción de hueso alveolar y la expresión de otras quimioquinas e interleuquinas como IL-1 β , IL-6 e IL-8, por lo que se ha vinculado con la generación del saco periodontal en los primeros estadios de la periodontitis y, en un contexto de OSCC, se relacionaría con la migración, invasión y angiogénesis tumoral [81, 82, 104]. Por otro lado, el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumentó de manera sinérgica los niveles de IL-8, lo cual es sumamente interesante puesto que se ha observado que esta citoquina promueve la progresión de la periodontitis mediante la promoción de la migración de GECs y la prevención de la apoptosis de las mismas [105]. Además, la IL-8 se relaciona con cambios en términos

de promoción celular, la regulación del ciclo celular, migración y angiogénesis, por lo que no solo sería importante para el desarrollo de la periodontitis, sino que también para el vínculo de dicha patología con el desarrollo de OSCC. Es más, se ha propuesto esta citoquina como un posible biomarcador salival de este tipo de cáncer debido a que ninguna de las enfermedades que puede afectar la cavidad oral eleva la cantidad de IL-8 a los niveles que se han detectado en muestras salivales de pacientes afectados por OSCC [85, 86].

Con el objetivo de vincular los cambios observados en la expresión de las citoquinas proinflamatorias analizadas con el factor de transcripción NF- κ B, se procedió a evaluar sus niveles proteicos mediante Western blot. Los resultados obtenidos demuestran que solo la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* logró aumentar los niveles de la subunidad p65 de este factor de transcripción, mas no el cocultivo de ambas, lo cual podría relacionarse a los cambios observados en inflamación en modelos de coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en modelos *in vivo* [74, 75]. Sin embargo, es necesario determinar también los niveles de la versión activa de NF- κ B, es decir, su forma fosforilada puesto que puede haber cambios en ella aun así no existan cambios en los niveles totales de la proteína [95]. Cuando NF- κ B es fosforilado en su residuo Ser536, este se activa y transloca desde el citoplasma al núcleo celular, promoviendo así la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [36, 91]. Acorde a lo observado en estos resultados, es posible desprender que ninguna de las condiciones experimentales utilizadas produce variaciones en los niveles de pNF- κ B. Sin embargo, se requieren más replicados biológicos para así disminuir la desviación de los datos.

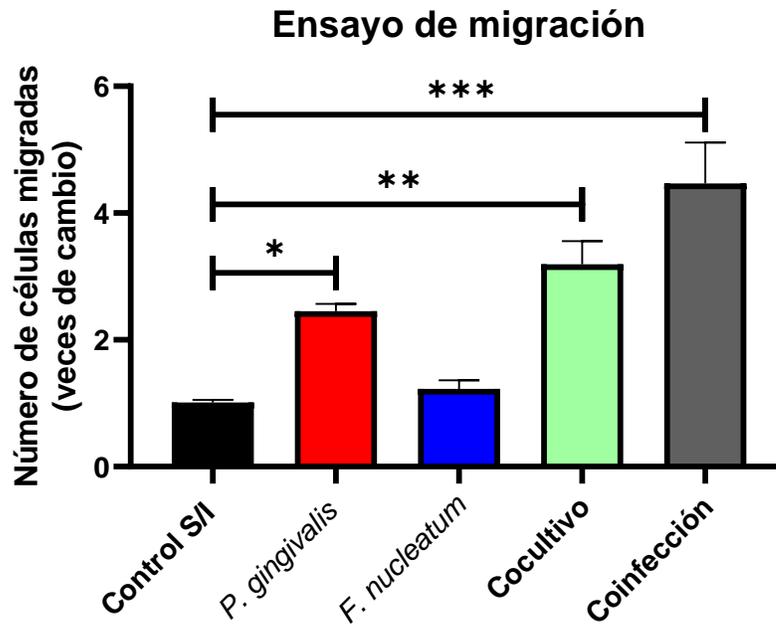
En vista de lo obtenido respecto a la activación de NF- κ B tras infectar con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, es lógico explorar la posible participación de otros factores de transcripción que regulen la expresión de los mediadores proinflamatorios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, como, por ejemplo, STAT3. Se ha reportado que tanto *P. gingivalis* como *F. nucleatum* activan a STAT3 en GECs y macrófagos, respectivamente, gracias a la activación del receptor TLR4 [30, 116]. Es más, en modelos murinos *in vivo* de coinfección crónica de epitelio lingual con estas bacterias, se describió que se promueve la activación del eje IL-6/STAT3, culminando en la formación de tumores de mayor

tamaño y más invasivos [36]. El factor de transcripción STAT3 regula la expresión de numerosas citoquinas y quimioquinas, entre las cuales se encuentran IL-1 β , IL-6 e IL-8 y, al mismo tiempo, estas mismas proteínas pueden inducir la activación de STAT3, dando lugar a una retroalimentación positiva entre las citoquinas mencionadas y STAT3 [117]. Por ende, este factor de transcripción podría jugar un rol en el aumento de la expresión de mediadores inflamatorios que se reportan en este trabajo de tesis.

A continuación, con la finalidad de relacionar los incrementos observados en los perfiles de expresión de citoquinas proinflamatorias, y teniendo en cuenta sus efectos descritos anteriormente en un contexto de periodontitis y OSCC, se realizaron experimentos de viabilidad celular. Como se describió en la **Figura 10**, el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* no generó cambios significativos en la viabilidad celular de cultivos OKF6/TERT2, lo cual podría explicarse con los resultados que se han obtenido en paralelo a este trabajo. Parte de los resultados que se han producido en el marco del proyecto son derivados de experimentos de qPCR en los que se evaluó la expresión de distintos genes relacionados a la proliferación y al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) (tesis en progreso de Martín Pacheco, estudiante de la Dra. Denisse Bravo). Entre estos, se determinó que la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* no genera cambios en los niveles de ciclina D1 en GECs, lo cual es importante puesto que esta proteína está relacionada con el progreso y transición de las fases G1/S del ciclo celular [106]. Adicionalmente, la infección con el monocultivo de *P. gingivalis* produjo un aumento en la expresión de dicha ciclina, lo que se condice con lo obtenido previamente en el laboratorio donde se reporta un aumento del 30% de la viabilidad o proliferación celular tras la infección con *P. gingivalis*, lo cual sería dependiente del OAg de su LPS [47]. Asimismo, los resultados paralelos obtenidos demuestran que la infección con el monocultivo de *P. gingivalis* y la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumentan la expresión génica de c-myc, lo cual nuevamente se correlaciona con lo reportado previamente por nuestro grupo [47], puesto que las funciones de este gen se vinculan con la progresión del ciclo celular y la inhibición de los inactivadores de dicho proceso, como las proteínas p21 y p27 [112]. Sin embargo, en este trabajo no se observó un aumento significativo de la viabilidad celular al infectar con el monocultivo de *P. gingivalis*, lo cual podría explicarse por la carencia de normalidad de los datos

obtenidos, el número de replicados biológicos utilizados para el análisis estadístico o incluso por el número de pasajes de los cultivos celulares utilizados para este ensayo, lo cual difiere de lo exhibido por Soto *et al*, 2016, donde se obtuvieron datos que respondían a una distribución normal, además de utilizar un mayor número de replicados biológicos y cultivos celulares de menor número de pasajes. Por otro lado, para complementar el resultado obtenido en el ensayo de MTS, se realizó un experimento de azul de tripán donde se aprecia que los datos se comportan de una manera similar a lo obtenido previamente de los ensayos MTS de viabilidad celular (**Figura 10**). Sin embargo, al tener solo dos replicados biológicos de este ensayo de azul de tripán, recomendamos aumentar el número de experimentos para así aplicar un test estadístico adecuado.

Al interactuar con su receptor cognado, las citoquinas regulan una gran gamma de procesos celulares como la proliferación celular, angiogénesis, migración e invasión celular, etc [81, 82, 85]. Las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-8 se relacionan estrechamente con la migración celular, puesto que se ha descrito de que ambas promueven la activación del factor de transcripción NF-kB, el cual regula la expresión de genes relacionados a EMT, promoviendo así un fenotipo celular más invasivo [82, 86]. En un contexto de periodontitis, la migración celular es altamente importante en su progresión puesto que contribuye a la formación del saco periodontal y a un incremento en su profundidad mediante la migración de las células gingivales epiteliales unidas al esmalte dental [104]. Por lo tanto, tomando en cuenta el incremento en la expresión obtenida de TNF- α e IL-8, es que se decidió ir más allá de los objetivos de esta tesis y se procedió a evaluar las consecuencias de la infección del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sobre la migración de las células OKF6/TERT2. Como se puede observar en la **Figura 18**, tanto la infección con el monocultivo de *P. gingivalis*, el cocultivo y la coinfección aumentan el número de células migradas en 2,4; 3,2 y 4,5 veces de cambio respectivamente en comparación al control sin infectar S/I.



Condiciones experimentales OKF6/TERT2

Figura 18. Efectos del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* sobre la migración de GECs.

Se aprecia el conteo de las células OKF6/TERT2 migradas tras 2 h de estímulo a una matriz de fibronectina y posteriormente teñidas con cristal violeta, expresadas en veces de cambio. Los datos expuestos corresponden al promedio de las células migradas observadas en 7 campos distintos. ONE-way ANOVA, post-test de Dunnet. * Indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$.

Como se puede observar, el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta la migración de GECs en mayor grado que las infecciones con los monocultivos de dichas bacterias, lo cual se condice con lo obtenido en los perfiles de expresión génica de las citoquinas proinflamatorias, sobre todo en aquellos resultados de TNF- α e IL-8 ya que ambas proteínas están vinculadas a la migración celular y, por consiguiente, a la progresión y severidad de la periodontitis [104]. Cabe destacar que este resultado se correlaciona con lo obtenido de forma paralela en el laboratorio, donde se demostró que la infección con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* produce cambios en la expresión génica de ciertos genes relacionados al complejo proceso de EMT, como lo son el incremento en vimentina y la disminución en E-cadherina (tesis en progreso de

Martín Pacheco, estudiante de la Dra. Denisse Bravo). Adicionalmente, en un estudio sobre la expresión de vimentina y E-cadherina en muestras de tejidos de pacientes con OSCC, se reportó que a medida que se desarrolla el cáncer y se pierde la diferenciación del tejido, la expresión de vimentina aumenta y la de E-cadherina disminuye, ambas de manera progresiva, lo cual es concordante con lo exhibido por nuestro grupo en los ensayos de migración y en los perfiles de expresión de genes relacionados a EMT [113].

A continuación, se evaluaron los niveles y distribución celular del receptor TLR4 mediante Western blot e IFI debido a que, dentro de su cascada de señalización, se encuentra la activación del factor de transcripción NF- κ B y la expresión de mediadores inflamatorios [43]. Este receptor ha sido ampliamente estudiado y se ha determinado que tanto *P. gingivalis* como *F. nucleatum* gatillan señales celulares vía TLR4 no solo gracias a sus respectivos LPS, sino que también -en el caso de *P. gingivalis*- gracias a su fimbria, promoviendo así la activación de NF- κ B y la transcripción de diversas citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [36,43,44,47,63]. Los resultados demuestran que no hay cambios ni en los niveles proteicos de TLR4 ni en su distribución celular en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas. Lo anterior podría explicarse mediante el proceso de *shedding* del receptor, lo cual ya se ha comprobado previamente con el receptor TLR2, donde determinadas metaloproteinasas proteolizan el ectodominio de esta proteína, dando como resultado una versión soluble que actúa como regulador negativo de la función del mismo [107].

Debido a que ha sido ampliamente demostrado que tanto *P. gingivalis* como *F. nucleatum* actúan vía TLR4 para así gatillar diversas respuestas celulares, y tomando en consideración que dentro de la cascada de señalización de dicho receptor se encuentra la activación de NF- κ B y subsiguiente expresión de citoquinas proinflamatorias, se procedió a estudiar el papel de TLR4 en los cambios reportados en el perfil de expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y los niveles de p65 [36, 43, 44, 47, 63]. Para llevar a cabo lo anterior, se realizó un silenciamiento del receptor utilizando un shRNA contra TLR4, disminuyendo así su expresión en un 67% aproximadamente (revisar material suplementario). Al analizar los niveles de TLR4 y p65, se observó que no hay cambios significativos en los niveles de TLR4 tras la infección, además de que ninguna de las condiciones experimentales utilizadas lograría restablecer los niveles de

p65 al nivel del control sin transducir, lo cual es lógico puesto que se disminuyó la expresión del receptor. No obstante, al analizar el perfil de expresión de las citoquinas proinflamatorias tras el silenciamiento del receptor TLR4 y compararlo contra el perfil de las células sin transducir, fue posible determinar que solo se redujo la expresión de IL-1 β (de 4,48 a 3,4 veces de cambio) e IL-6 (de 3,73 a 1,46 veces de cambio), destacándose la última citoquina mencionada, puesto que se perdió la significancia estadística. Sin embargo, el nivel de los transcritos de TNF- α e IL-8 no cambió tras realizar el silenciamiento, lo cual podría deberse a un particular motivo. Los receptores TLR4 y TLR2 comparten -dentro de su cascada de señalización- los adaptadores MyD88 y TIRAP (adaptador similar a MyD88), los cuales interactúan en la membrana plasmática y permiten la transactivación de NF- κ B tras la unión del ligando cognado de TLR4 o TLR2, es decir, la activación de TLR2 permite la fosforilación de NF- κ B y la subsiguiente regulación de la respuesta inflamatoria gracias a los adaptadores MyD88 [108]. Por ende, recomendamos realizar experimentos con una línea celular estable que ha sido silenciada contra TLR2 o utilizar inhibidores químicos contra el adaptador MyD88 para profundizar esta hipótesis.

Como control del experimento de qPCR en cultivos shTLR4, se realizó la transducción de un plasmidio codificante para una secuencia shScramble en células OKF6/TERT2, el cual no se unirá a ningún mRNA. Al observar los resultados de este único replicado biológico es posible desprender el mismo comportamiento de los datos observado en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-8 que en aquellos experimentos de qPCR realizados en células sin transducir (TLR4⁺), lo que sugiere que los cambios exhibidos al realizar el silenciamiento de TLR4 son exclusivamente a raíz de la infección, no del proceso de transducción. No obstante, el comportamiento de los datos que se aprecia en la expresión de IL-6 es distinto a aquel obtenido a partir de cultivos TLR4⁺, lo cual podría atribuirse a distintas razones, como, por ejemplo, mala ejecución de la técnica de qPCR, por lo que sugerimos aumentar el número de replicados biológicos para así tener un resultado más confiable.

Para resumir, en este trabajo de tesis se estandarizó un cocultivo entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, de tal manera que tras 24 h de incubación se encontrasen ambas bacterias a una razón similar. Lo anterior con el objetivo de demostrar que la infección con el

cocultivo genera un aumento en la expresión de ciertas citoquinas proinflamatorias, destacando un incremento de carácter sinérgico en la expresión de IL-6 e IL-8. Además, se demostró que el receptor TLR4 sería responsable del aumento sinérgico observado en la expresión IL-6 y en el incremento de IL-1 β (**Figura 19**). Los resultados expuestos en este trabajo demuestran por primera vez que el cocultivo y subsiguiente infección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* tiene un efecto sinérgico en la expresión de mediadores proinflamatorios, lo que nuevamente sugiere dar énfasis a los modelos de cocultivo al momento de estudiar enfermedades polimicrobianas puesto que permiten dilucidar, comprender y caracterizar la naturaleza de las interacciones patógeno-patógeno y patógeno-hospedero que ocurren en estas patologías, haciendo hincapié en las bacterias que jugarían un papel clave en la patogénesis de enfermedades polimicrobianas como la periodontitis. Dada la alta prevalencia de la periodontitis a nivel mundial y en Chile, su vínculo con OSCC, y tomando en cuenta que *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son claves en la patogénesis de la periodontitis, es necesario conocer más sobre sus mecanismos de interacción patógeno-hospedero con la finalidad de evaluar aproximaciones terapéuticas para tratar este problema de salud pública.

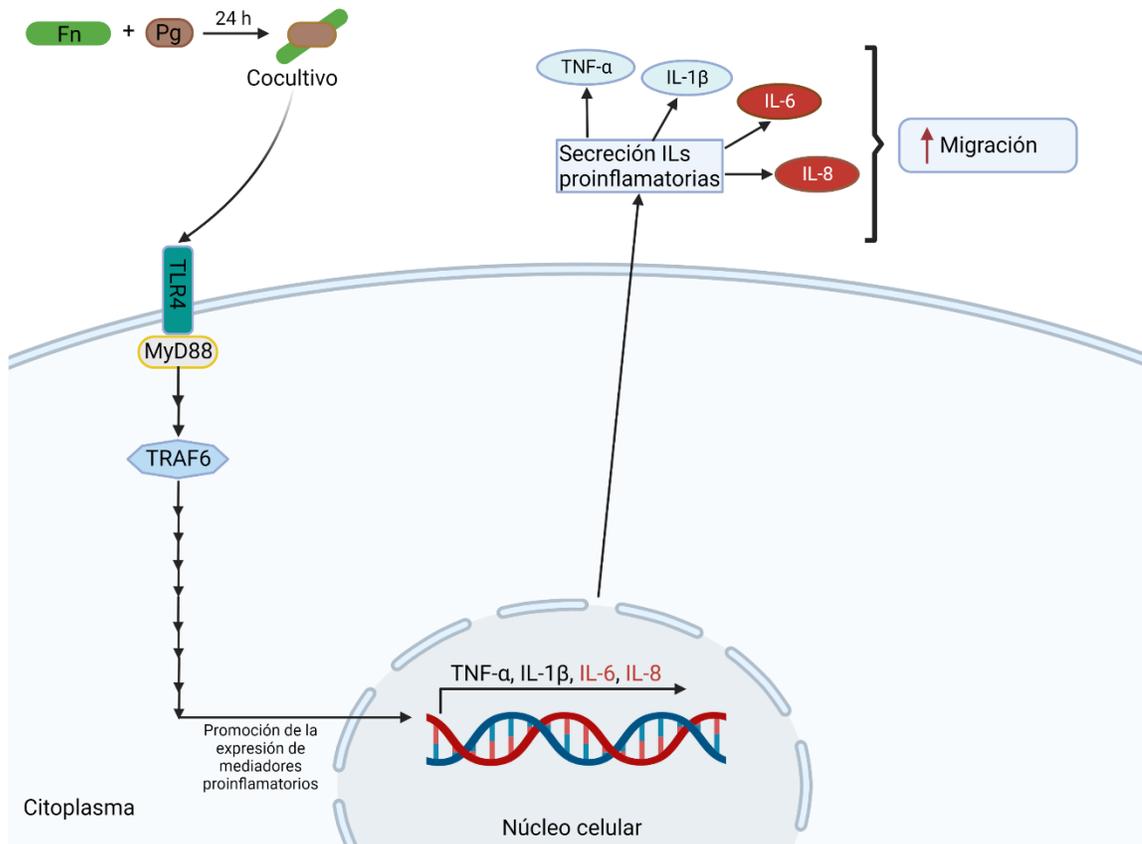


Figura 19. Modelo propuesto sobre el efecto del cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en la expresión de citoquinas proinflamatorias de GECs. Durante el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* se producirán cambios que impactarán la virulencia de una o ambas bacterias que, además, son capaces de interactuar físicamente. La infección con el cocultivo produce un aumento en la expresión de TNF- α e IL-1 β , y un incremento de carácter sinérgico de IL-6 e IL-8. Asimismo, el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* gatilla un aumento en la migración de GECs, lo que probablemente se deba a los cambios en el perfil de expresión de citoquinas proinflamatorias. Además, el receptor TLR4 desempeña un rol en el incremento observado en IL-6 e IL-1 β .

7. Conclusiones

1. Se estandarizó un cocultivo entre *P. gingivalis* y *F. nucleatum* el cual se encuentra a una razón de 1:1,3 respectivamente, tras 24 h de incubación. En estas condiciones, las bacterias son capaces de interactuar físicamente.
2. La infección de células OKF6/TERT2 con el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* incrementó la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β y, de IL-6 e IL-8 de manera sinérgica. En concordancia con el incremento observado en la expresión de TNF- α e IL-8, el cocultivo de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumentó la migración de células epiteliales gingivales línea OKF6/TERT2.
3. La expresión génica de IL-1 β e IL-6 disminuye al silenciar TLR4, sugiriendo que los efectos que promueve el cocultivo en células OKF6/TERT2 en términos de la expresión de estas citoquinas es dependiente -en parte- de la señalización del receptor TLR4.

8. Glosario

a) Adhesinas: se definen como moléculas adhesivas en las superficies de bacterias capaces de interactuar con los receptores de las células a infectar, facilitando así la adhesión e invasión a varios tipos celulares [64].

b) Asacarolítico: organismos que no utilizan azúcares como fuente de energía. Pueden, por ejemplo, utilizar compuestos nitrogenados como fuentes de energía como los aminoácidos derivados de la destrucción de tejidos [41].

c) Balsa lipídica: microdominios de la membrana celular ricos en colesterol que segregan efectores moleculares específicos en unidades funcionales para una señalización intracelular eficiente [73].

d) Biopelícula oral: se definen como comunidades bacterianas organizadas en tres dimensiones, en donde los microorganismos que la componen se encuentran embebidos en una matriz de exopolisacáridos. Esta estructura tridimensional se encuentra anclada a una superficie sólida como el esmalte del diente (en el saco periodontal, principalmente), la superficie de la raíz o de implantes dentales [55].

e) Citoquinas: Las citoquinas se definen como pequeñas proteínas solubles -cuyo peso molecular varía entre 5-20 kDa- que se unen a su receptor afín y son capaces de regular funciones celulares y genéticas como el control de la proliferación y diferenciación celular, migración, la respuesta inmune del hospedero, entre otras [79].

f) E-cadherina: se define como una glicoproteína de transmembrana localizada en el tejido epitelial que actúa como una molécula de adhesión y que, además, actúa como transductor de señales el cual dirige la formación de complejos proteicos del citoesqueleto celular [113].

g) Factores de virulencia: moléculas que causan daño al hospedero de diferentes formas, las cuales se encuentran involucradas en procesos tales como la colonización del hospedero, escape del sistema inmune, inmunosupresión, invasión y escape del medio intracelular, extracción y adquisición de nutrientes y la liberación de nuevos factores de virulencia [48].

h) Fagocitosis: proceso de internalización de sustancias por parte de las células, como parte de su sistema primitivo de supervivencia [99].

- i) Hemina: compuesto análogo de la hemoglobina que une el hierro del hospedero y representa el sistema de adquisición de este nutriente por parte de *P. gingivalis*. Su concentración *in vivo* varía acorde al grado de ulceración vascular en la periodontitis [71].
- j) Lipopolisacárido: definido como el mayor componente de la membrana externa de bacterias Gram negativo. Este consiste en tres componentes principales; el lípido A (región conservada interna sin especificidad de especie), el oligosacárido central o *core* (estructura puente entre el lípido A y el antígeno O) y el antígeno O (región altamente variable que consiste en cadenas de oligosacáridos) [48].
- k) Matriz extracelular: se define como una red tridimensional altamente dinámica compuesta de macromoléculas como colágeno, proteoglicanos/glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, lamininas y otras glicoproteínas. Estos componentes de la matriz se unen entre ellos y, adicionalmente, unen los receptores de adhesión celulares, conformando así una compleja red, donde la célula es capaz de residir en todo tejido y órgano [98].
- l) Moléculas de adhesión: consisten en proteínas ancladas a la membrana celular que juegan un rol crucial en establecer el contacto célula-célula, promoviendo la interacción celular y evitando la muerte celular [50].
- m) PAMPs: llamados patrones moleculares asociados a patógenos. Entre estos se encuentran el peptidoglicano bacteriano, el LPS de bacterias Gram negativo, lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias gram-positivas, lipopéptidos de micoplasmas, etc [42].
- n) Periodonto: estructura de colágeno que rodea la estructura del diente. Es requerido para mantener la pieza dental anclada al hueso alveolar para que esta mantenga su forma y cumpla su determinada función. El periodonto se compone de la gingiva, hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal, todos conocidos como los tejidos de soporte del diente [79].
- o) PRRs: subtipo de receptores capaces de reconocer componentes bacterianos o moléculas producto de la destrucción de tejido como “señales de peligro”, gatillando una respuesta inflamatoria [81].
- p) Receptores TLR: familia de receptores pertenecientes a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en células inmunes y epiteliales, capaces de reconocer y responder ante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o

patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Estos receptores poseen un ectodominio compuesto de repeticiones de leucina, sector clave para el reconocimiento de PAMPs [42].

q) Saco o bolsillo periodontal: definido como un surco patológico alrededor del diente en el margen subgingival, es decir, el espacio formado entre la gingiva inflamada y el diente. Se considera un surco gingival periodontalmente sano si es que su profundidad es menor o igual a 0,5 mm. En este, ocurre la destrucción del tejido periodontal y la resorción de hueso alveolar [97].

r) Superficie supragingival dental: se refiere a la zona superficial de la pieza dental, que es el lugar físico de crecimiento de la biopelícula supragingival [100].

s) *Shedding*: proceso de corte proteolítico del ectodominio (dominio extracelular de un receptor integral de membrana) de un receptor TLR, dando como producto un fragmento soluble que actuará como regulador negativo del mismo. Esto se ha comprobado en receptores TLR2 y TLR4 [107].

t) Temperatura de hibridación o *melting*: temperatura a la cual el 50% de las hebras de DNA se encuentran desnaturalizadas o separadas.

u) Tiempo de generación: tiempo que se demora una población bacteriana en duplicarse mediante fisión. Este varía de una especie bacteriana a otra, así como también varía entre las mismas especies [101].

v) Transición epitelio-mesénquima (EMT): proceso que permite que las células epiteliales asuman un fenotipo mesenquimal al sufrir diversos cambios bioquímicos. Dicho fenotipo se caracteriza por ser de un mayor carácter migratorio, más invasivo, mayor resistencia a la apoptosis y por poseer una mayor capacidad de producción de componentes de la matriz extracelular [111].

w) Vimentina: proteína del citoesqueleto celular con bajos niveles de expresión en tejido epitelial normal o sano, la cual se vincula con la invasión y la metástasis de células cancerígenas [113].

9. Material suplementario

9.1 Estandarización del *knockdown* del receptor TLR4 en células OKF6/TERT2

Con la finalidad de evaluar la eficacia del *knockdown* contra el receptor TLR4, se realizó un Western blot contra dicho receptor, utilizando como control un extracto proteico de cultivos OKF6/TERT2 sin transducir (OKF6). Lo anterior fue realizado en el marco de mi unidad de investigación de postgrado con la ayuda del Dr. Cristopher Soto del Laboratorio de Microbiología Oral. Como se puede observar en la **Figura S1**, se obtuvo que los plásmidos -conteniendo la secuencia shTLR4- extraídos desde las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) 3264-93 (sh93), 3264-94 (sh94), 3264-95 (sh95) y posteriormente transducidos a los cultivos OKF6, lograron un silenciamiento del receptor TLR4 de 61%, 67% y 50%, respectivamente. Adicionalmente, se extrajo un plásmido conteniendo una secuencia aleatoria denominada shScramble (shSCR), la cual se utilizó como control de transducción puesto que no afecta los niveles totales de la proteína de interés.

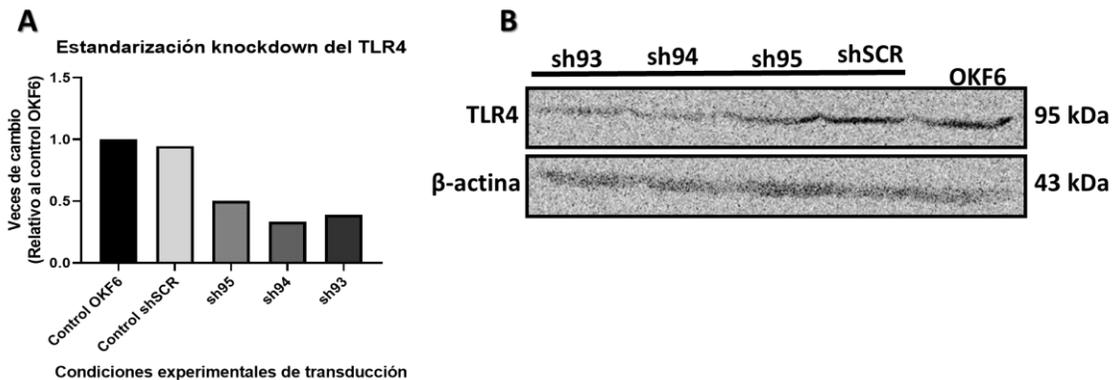


Figura S1. Estandarización del *knockdown* del receptor TLR4. (A) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas demuestran que los plasmidios utilizados disminuyen la expresión proteica del receptor TLR4 en un 61%, 67% y 50%. Las veces de cambio fueron normalizadas a 1 acorde a lo observado en el eje Y del gráfico. El análisis de las bandas se realizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ. (B) Blot representativo de los cambios en los niveles de TLR4 y β -actina en células gingivales epiteliales transducidas con un plásmido conteniendo una secuencia shTLR4 [104]. n=1.

9.2 Estandarización del efecto de *F. nucleatum* ATCC 10953 sobre la viabilidad de células OKF6/TERT2

Con el objetivo de dilucidar el efecto de las infecciones con los monocultivos de *F. nucleatum* ATCC 10953 a diferentes MOIs sobre cultivos de células OKF6/TERT2, se procedió a realizar un ensayo de viabilidad celular MTS de igual forma como se ha hecho con *P. gingivalis* en el laboratorio. Como se puede apreciar en la **Figura S2**, ninguna de las condiciones experimentales afecta la viabilidad celular de GECs, por ende, se utilizará la MOI=100 para las futuras infecciones con *F. nucleatum* puesto a que no solo es la más utilizada en bibliografía, sino que también es la utilizada para las infecciones con *P. gingivalis* en nuestro laboratorio.

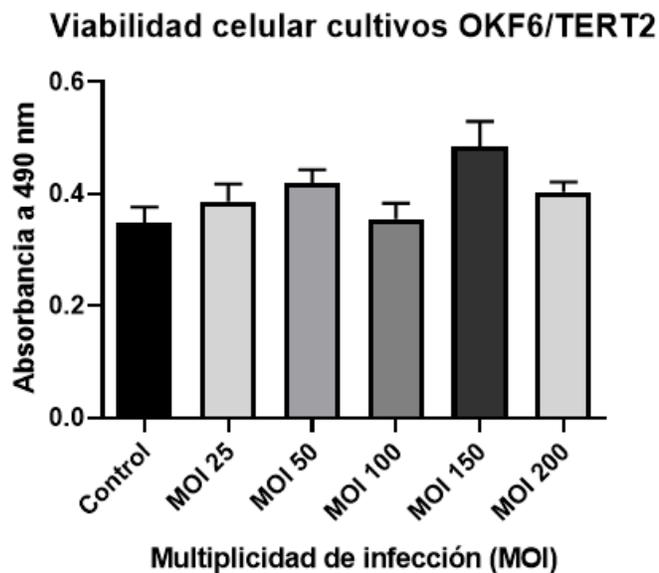


Figura S2. Efectos de la infección a distintas MOIs con monocultivos de *F. nucleatum* sobre la viabilidad celular de cultivos OKF6/TERT2. Se observan los niveles de absorbancia a 490 nm evaluados en células OKF6/TERT2 tras ser infectadas con monocultivos de *F. nucleatum*. La viabilidad celular de cada condición tratada fue comparada con la del control sin infectar (S/I). Los valores de absorbancia a 490 nm obtenidos se expresan en el eje Y. Kruskal-Wallis test, post-test Dunn's. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$.

9.3 Gradientes de temperatura de los partidores de qPCR

Con la finalidad de determinar la temperatura de *melting* (T_m) de los partidores a utilizar, se realizó una PCR convencional con una gradiente de temperaturas en un intervalo de 50°C-60°C y, adicionalmente, los productos de PCR obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para esto, se cargaron 2 µg de cDNA de cada muestra sometida a las distintas temperaturas y se realizó la electroforesis por 2 h. Como se puede apreciar en la **Figura S3**, a 60°C se aprecian bandas para todos los partidores utilizados, lo que indica que la T_m es óptima a dicha temperatura. Por ende, se utilizará esta temperatura para las futuras reacciones de qPCR. El tamaño esperado de los productos de PCR observado *in silico* se expone en la **Tabla 2**.

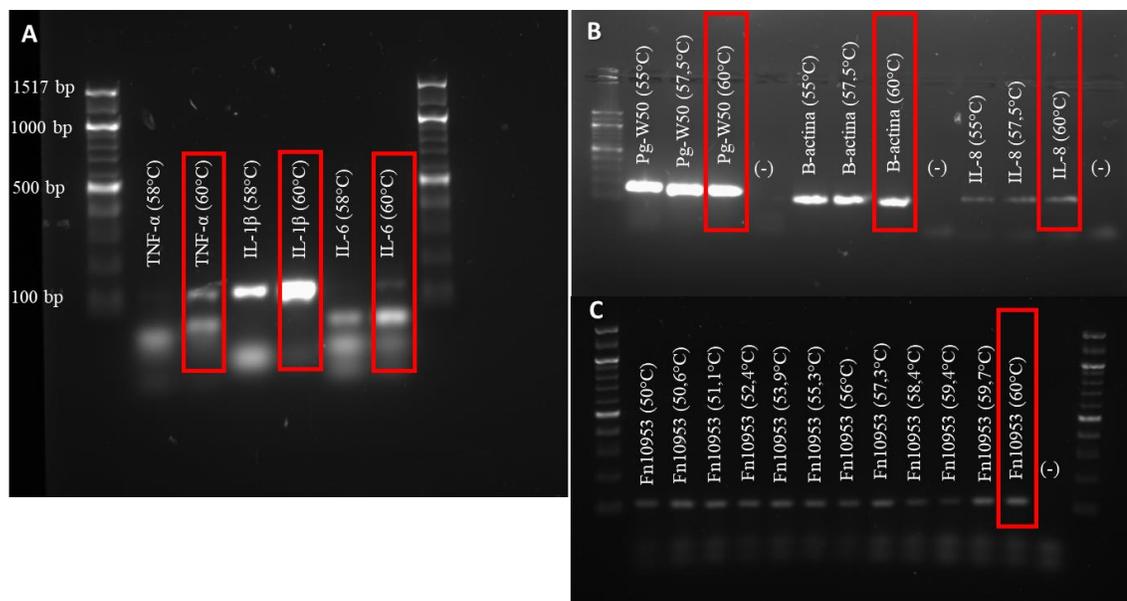


Figura S3. Amplicones obtenidos de los partidores de interés tras la gradiente de temperatura. Se aprecian las bandas obtenidas tras la electroforesis en un gel de agarosa al 2% para los partidores de (A) TNF- α , IL-1 β e IL-6, (B) *P. gingivalis*-W50, β -actina e IL-8, y (C) de *F. nucleatum*10953. El tamaño de todos los productos de PCR obtenidos fue previamente confirmado *in silico* utilizando la base de datos de NCBI.

Gen de interés	Tamaño amplicón <i>in silico</i> (pares de bases)
TNF- α	123
IL-1 β	131
IL-6	132
IL-8	153
β -actina	135
16S rRNA Pg-W50	198
16S rRNA Fn10953	104

Tabla 2: Tamaños teóricos de los amplicones de los genes de interés.

9.4 Estandarización de partidores de qPCR: curvas de calibración

A continuación, se procedió a estandarizar la curva de calibración de los partidores para TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, es decir, la dilución del cDNA que se debía utilizar para obtener una correcta amplificación de los productos. Para esto, se diluyó una muestra de cDNA de cultivos celulares OKF6/TERT2 -que se encontraba a una concentración inicial 2.500 ng/ μ L- acorde a distintos factores de dilución. En la **Figura S4** se exponen las curvas de calibración obtenidas tras utilizar las siguientes muestras: sin diluir, dilución 1:5, dilución 1:25, dilución 1:125, dilución 1:625. Por otro lado, en la **Tabla 3** se exponen los diferentes partidores utilizados, la linealidad obtenida (R^2) y el porcentaje de eficiencia de la reacción.

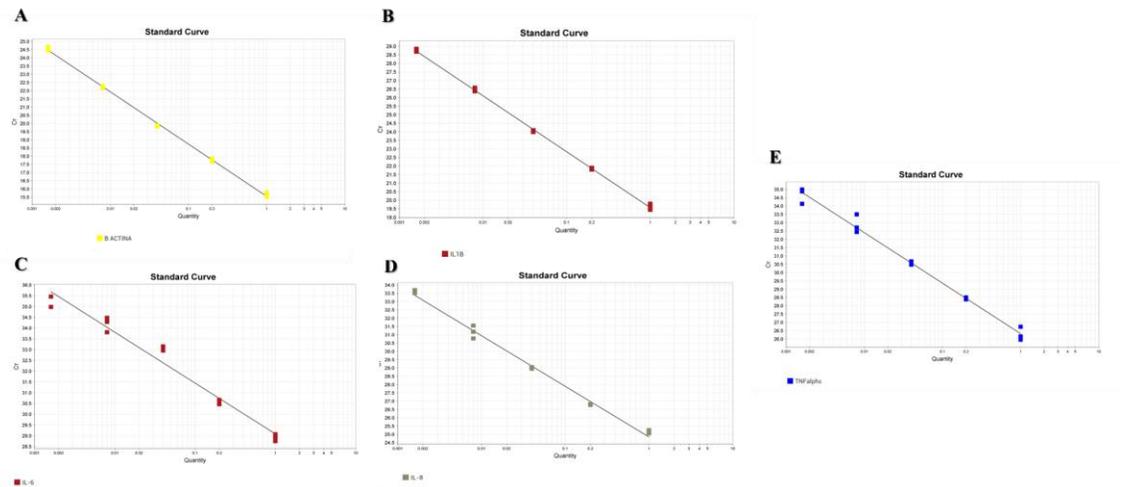


Figura S4. Curva de calibración para las citoquinas proinflamatorias y gen *housekeeping*.

Se aprecian las distintas curvas de calibración para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y β -actina. Todos los puntos se encuentran cercano a la recta, dando como resultado una linealidad (R^2) de 0,99-0,97 aproximadamente, es decir, se obtuvo como resultado una eficiencia apropiada.

Gen de interés	Eficiencia partidores (%)	R^2
β -actina	105,84	0,998
TNF- α	113,52	0,988
IL-8	112,686	0,992
IL-1 β	102,16	0,999
IL-6	165,273	0,972

Tabla 3. Lista de la eficiencia de los partidores utilizados para las reacciones de qPCR.

9.5 Extracción plásmidio conteniendo shTLR2

Con la finalidad de purificar los plásmidos conteniendo la secuencia codificante shTLR2, y para luego confirmar su concentración e integridad, se realizó el proceso de extracción mediante el uso del kit Qiagen Plasmid Mini kit (Hilden, Ger) y, posteriormente, una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Para lo anterior, se purificaron plásmidos desde 5 cultivos de *E. coli* 3268, cada uno transformado con el plasmidio conteniendo el gen codificante del shRNA contra TLR2. Estos cultivos se denominaron como: 18, 19, 20, 21 y 22, con la finalidad de distinguirlos entre ellos. Todas las muestras obtenidas se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% y se realizó una electroforesis por 2 h. En la

Figura S5 se observa que todas las muestras obtenidas presentan integridad óptima puesto que no se aprecia mayor *smearing* o chorreo de las bandas. Asimismo, en la **Tabla 4** se encuentran las concentraciones obtenidas en términos de ng/ μ L de todas las muestras utilizadas, además de la razón de absorbancia 260/280 nm, lo cual da cuenta de la pureza del material genético obtenido. El hecho de que los valores obtenidos de dicha razón sean de 1,9 aproximadamente para todas las muestras, es prueba de que la pureza es óptima [109].

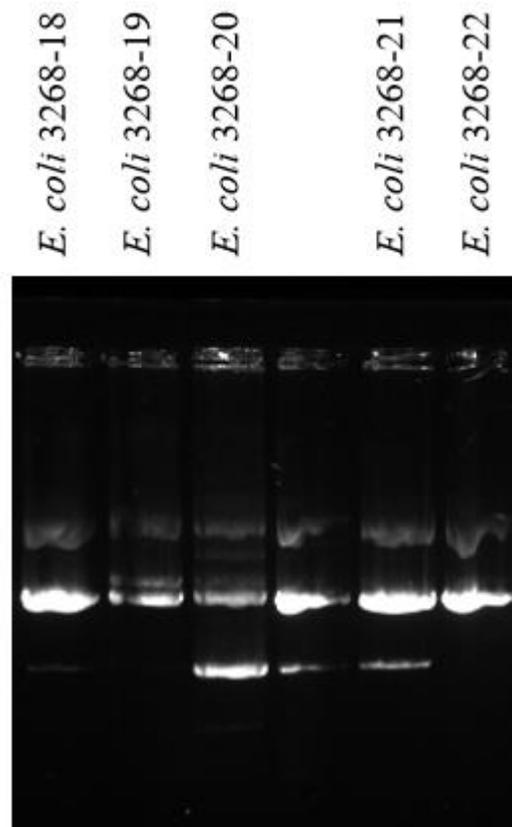


Figura S5. Electroforesis en gel de agarosa de los plasmidios codificantes para la secuencia shTLR2. Se aprecian los perfiles de migración obtenidos tras la electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%- En este, se observan, de izquierda a derecha, los plasmidios extraídos desde los cultivos de *E. coli* 18, 19, 20, el cultivo *E. coli* 21 que se cargó en el gel de manera incorrecta, el cultivo *E. coli* 21 nuevamente, pero cargado de manera correcta y, por último, el plasmidio proveniente del cultivo de *E. coli* 22. Todas las muestras exhiben una integridad óptima puesto que no se observa mayor chorreo o *smearing*.

Cepa <i>E. coli</i>	Razón A(260/280)	Concentración (ng/ μ L)
3262-18	1,928	626,5
3262-19	1,917	242,5
3262-20	1,917	542,5
3262-21	1,961	1051
3262-22	1,955	968,5

Tabla 4. Lista de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas y la concentración obtenida de los plásmidos shTLR2 purificados.

9.6 Inmunofluorescencia contra TLR2 en GECs

Con el objetivo de determinar la distribución periférica e intracelular del receptor TLR2, y tomando en consideración que puede transactivar el factor de transcripción NF- κ B [108], se realizó una IFI acorde al protocolo estipulado en el apartado 4.12 de la sección de metodología de este trabajo. Se marcó el receptor TLR2 con anti-TLR2 (1:100) (Cell Signaling Technologies) ligado a la sonda fluorescente Alexa Fluor 488 (exhibida en la imagen de color verde) y, adicionalmente, se utilizó la sonda Faloidina Alexa Fluor 633 (marca de color rojo) para marcar la actina F del citoesqueleto. En la **Figura S6** se observan los resultados preliminares obtenidos, donde se aprecia que la infección con el monocultivo de *P. gingivalis*, cocultivo y coinfección de ambas bacterias no producen cambios en la distribución intracelular del receptor TLR2 en células epiteliales gingivales. Sin embargo, parece existir una disminución en la expresión de TLR2 al infectar con el monocultivo de *F. nucleatum*. Pero, se requieren mayor número de ensayos para confirmar esta tendencia.

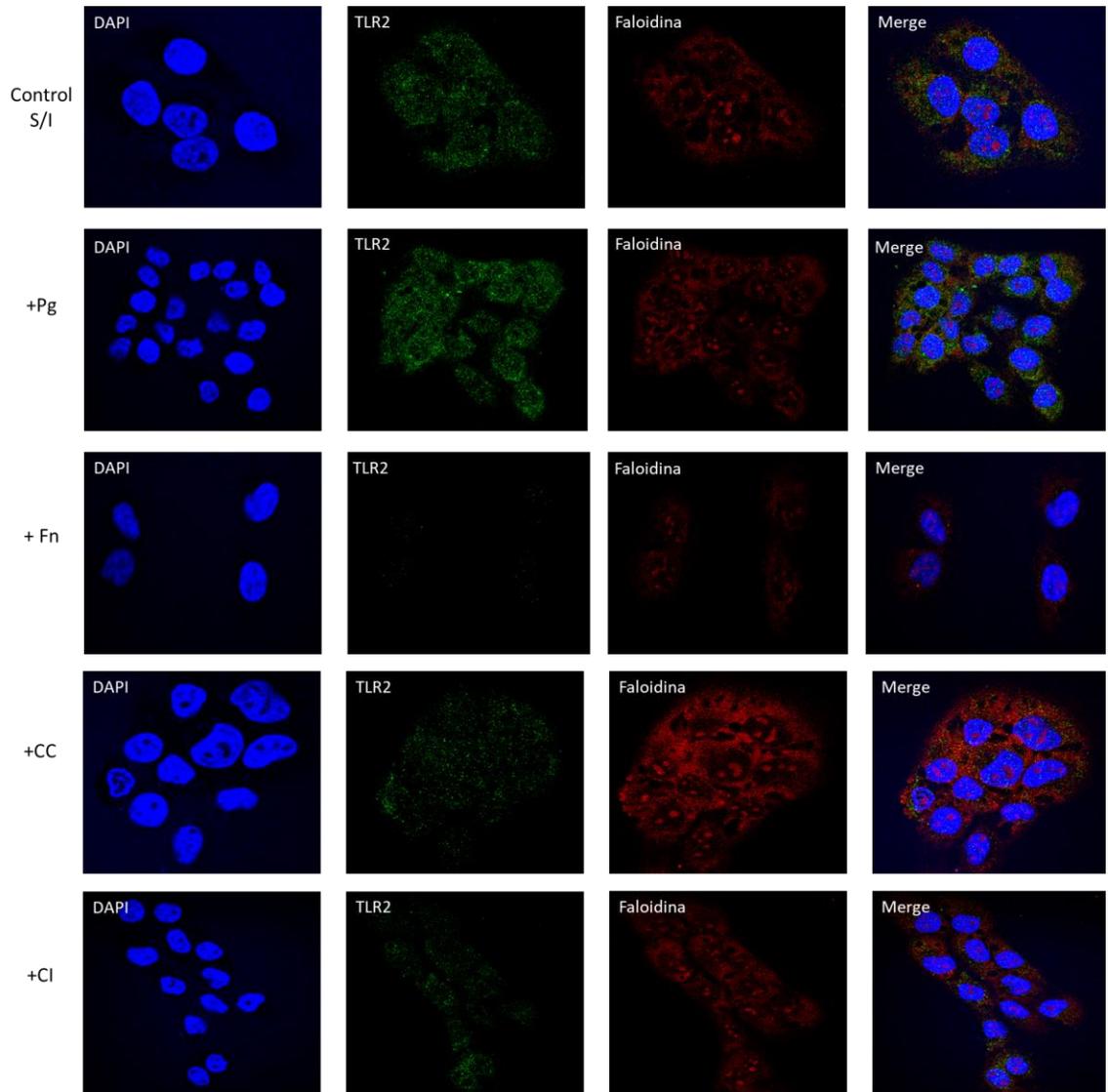


Figura S6. Resultados preliminares de inmunofluorescencia de TLR2. Las células OKF6/TERT2 fueron marcadas con anti-TLR2 (1:100) (Cell Signaling Technologies) ligado a la sonda fluorescente Alexa Fluor 488, además, se marcó el citoesqueleto celular con Faloidina Alexa Fluor 633 y se evaluó la distribución intracelular del receptor TLR2 mediante inmunofluorescencia. Se exponen las imágenes representativas de la microscopía confocal realizada.

9.7 Western blot contra TLR2: estandarización

Por último, con la finalidad de estandarizar el Western blot contra el receptor TLR2, se realizó un experimento de carga y desnaturalización de la proteína en cuestión. Tras realizar el protocolo de extracción de proteínas a partir de cultivos OKF6/TERT2 sin infectar (sección 4.9 de la metodología), se denaturaron las muestras incubándolas en una placa térmica a 70°C por 20 minutos. A continuación, en un gel al 10% de acrilamida/bisacrilamida, se depositaron 50-90 µg de proteína con el objetivo de determinar la concentración óptima de la muestra a cargar para obtener una banda proteica prolija. A forma de control, se utilizaron extractos proteicos provenientes de células AGS (células de tumor primario de epitelio gástrico) previamente infectadas con *Helicobacter pylori* (Hp), debido a que se ha comprobado que estas células aumentan la expresión de TLR2 al ser expuestas al LPS de *H. pylori* [110]. Como se puede apreciar en la **Figura S7**, el anticuerpo primario anti-TLR2 se une a la proteína de interés, dando como resultado una banda en cultivos AGS infectados con Hp y en cultivos de células OKF6/TERT2 sin infectar. Además, la banda de mayor intensidad de TLR2 en cultivos OKF6/TERT2 se obtiene al cargar de 60 µg en adelante, lo cual se explica basado en que esta línea celular expresa en menor cantidad este receptor en comparación al TLR4 [89]. Por ende, para futuros experimentos de Western blots contra TLR2, se utilizarán 60 µg de muestra para obtener una óptima resolución.

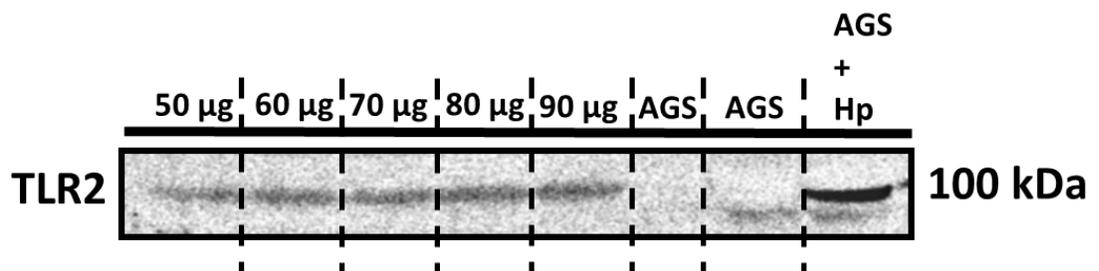


Figura S7. Estandarización Western blot contra TLR2. Blot representativo de la carga diferencial en la cantidad de muestra proteica. Lo anterior para observar bandas proteicas de TLR2, lo cual fue realizado en células OKF6/TERT2 sin infectar y en células AGS infectadas con *H. pylori* y sin tratar (AGS).

9.8 Estructura del plasmidio Mission pLKO.1-puro

Con el objetivo de realizar el *knockdown* del receptor TLR4 en células línea OKF6/TERT2, se utilizó el plasmidio comercial Mission shRNA Bacterial Glycerol Stock. Para clonar la secuencia, se incubaron cultivos de *E. coli* transformados en agar luria (LB) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina por 24 h, 37°C y 5% de CO₂. Lo anterior con el objetivo de evitar la curación del plasmidio pLKO.1-puro, el cual contenía la secuencia codificante del shRNA contra TLR4. A continuación, se inocularon colonias aisladas en un cultivo líquido de LB suplementado con ampicilina para luego proceder a la extracción del plasmidio en cuestión mediante el uso del kit Qiagen Plasmid Mini kit (Hilden, Ger). En la **Figura S8**, se aprecia el diagrama explicativo del plasmidio pLKO.1-puro, en donde se puede apreciar las distintas secuencias de interés del constructo. Dichas secuencias son: un promotor U6 (U6), un tracto central de polipurina (cppt), un promotor eucariótico de la quinasa fosfoglicerato humana (hPGK), un *cassete* de resistencia de puomicina para la selección en células eucariotas (puroR), una repetición terminal de inactivación 3' (SIN/3' LTR), un origen de replicación f1 (f1 ori), un *cassete* de resistencia a ampicilina para la selección bacteriana (ampR), un origen de replicación pUC, una repetición terminal larga 5' (5' LTR), una señal de empaquetamiento de RNA (Psi) y un elemento de respuesta Rev (RRE).

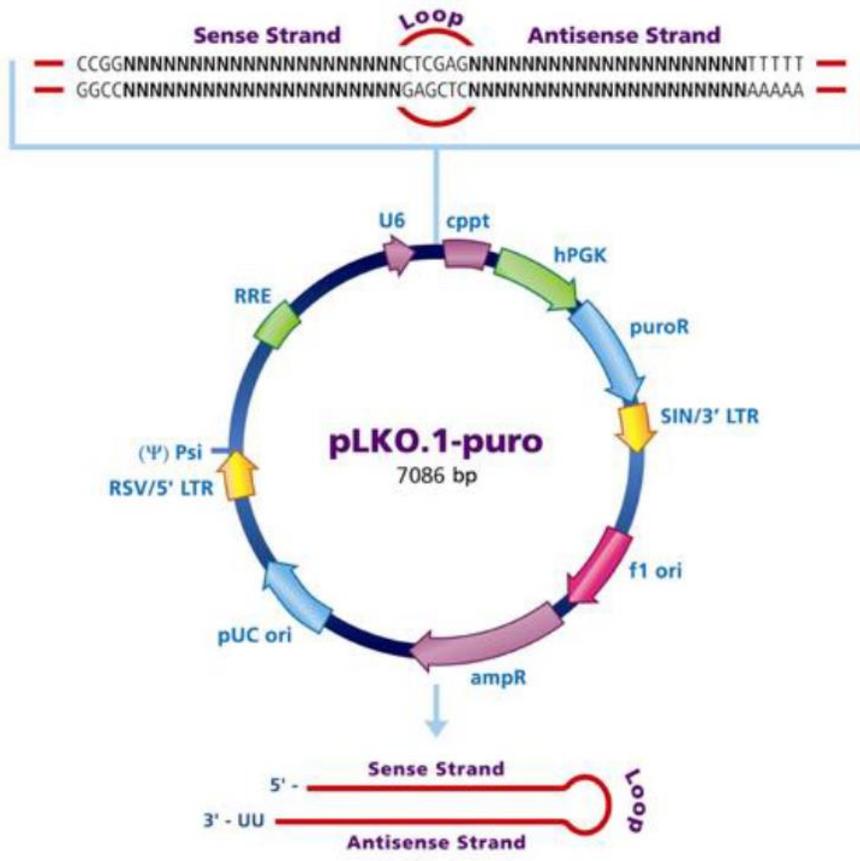


Figura S8. Estructura del plasmidio utilizado en el proceso de *knockdown* de TLR4. Se aprecia un diagrama explicativo del plasmidio pLKO.1-puro utilizado para el *knockdown* del receptor TLR4 en cultivos de células OKF6/TERT2.

10. Bibliografía

1. Hoare, A., Soto, C., Rojas-Celis, V., & Bravo, D. (2019). Chronic inflammation as a link between periodontitis and carcinogenesis. *Mediators of inflammation*, 2019, 1029857.
2. Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016-1025.
3. Larsson, L., Kavanagh, N. M., Nguyen, T. V., Castilho, R. M., Berglundh, T., & Giannobile, W. V. (2022). Influence of epigenetics on periodontitis and peri-implantitis pathogenesis. *Periodontology 2000*, 90(1), 125-137.
4. Papapanou, P. N., & Susin, C. (2017). Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both?. *Periodontology 2000*, 75(1), 45-51.
5. Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Munoz, A., Urzua, I., Aranda, W., Carvajal, P & Arteaga, O. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: first Chilean national dental examination survey. *Journal of periodontology*, 81(10), 1403-1410.
6. Albandar, J. M. (2005). Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dental Clinics*, 49(3), 517-532.
7. Tatakis, D. N., & Kumar, P. S. (2005). Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dental Clinics*, 49(3), 491-516.
8. Arigbede, A. O., Babatope, B. O., & Bamidele, M. K. (2012). Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 16(4), 487-491.
9. Sanz, M., Del Castillo, A. M., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J. R., D'Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Vlachopoulos, C & Wimmer, G. (2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of clinical periodontology*, 47(3), 268-288.
10. Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews immunology*, 15(1), 30-44.
11. Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., McIntosh, M., Alsam, A., Kirkwood, K., Lambris, J., Darveau, R & Curtis, M. A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell host & microbe*, 10(5), 497-506.

12. Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B. Y., & Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontology 2000*, 86(1), 57-78.
13. Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409-419.
14. Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular oral microbiology*, 29(6), 248-257.
15. Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine*, 21(3), 172-183.
16. Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26), 1650-1659.
17. Korniluk, A., Koper, O., Kemoná, H., & Dymicka-Piekarska, V. (2017). From inflammation to cancer. *Irish Journal of Medical Science (1971-)*, 186(1), 57-62.
18. Eiró, N., & Vizoso, F. J. (2012). Inflammation and cancer. *World journal of gastrointestinal surgery*, 4(3), 62-72.
19. Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217-222.
20. Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
21. Dhanuthai, K., Rojanawatsirivej, S., Thosaporn, W., Kintarak, S., Subarnbhesaj, A., Darling, M., Kryshtalskyj, E., Chiang, C., Shin, C., Choi, S., Lee, S & Shakib, P. A. (2018). Oral cancer: A multicenter study. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 23(1), e23-e29.
22. García-Martín, J. M., Varela-Centelles, P., González, M., Seoane-Romero, J. M., Seoane, J., & García-Pola, M. J. (2019). Epidemiology of oral cancer. In *Oral Cancer Detection* (pp. 81-93). Springer, Cham.
23. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941-1953.
24. Maraboli-Contreras, S., Adorno-Farias, D., Maturana-Ramirez, A., Rojas-Alcayaga, G., Fuentes-Alburquenque, M., & Espinoza-Santander, I. (2018).

Sobrevida de carcinoma oral de células escamosas: reporte de la Universidad de Chile. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 11(3), 147-151.

25. La Rosa, G. R. M., Gattuso, G., PEduLLà, E., Rapisarda, E., Nicolosi, D., & Salmeri, M. (2020). Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncology letters*, 19(4), 3045-3058. La Rosa, G. R. M., Gattuso, G., PEduLLà, E., Rapisarda, E., Nicolosi, D., & Salmeri, M. (2020). Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncology letters*, 19(4), 3045-3058.
26. Granulicatella, C. (2016). Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncol*, 56, e6-e8.
27. Nagy, K. N., Sonkodi, I., Szöke, I., Nagy, E., & Newman, H. N. (1998). The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral oncology*, 34(4), 304-308.
28. Katz, J., Onate, M. D., Pauley, K. M., Bhattacharyya, I., & Cha, S. (2011). Presence of *Porphyromonas gingivalis* in gingival squamous cell carcinoma. *International journal of oral science*, 3(4), 209-215.
29. Kim, Y. C., Ko, Y., Hong, S. D., Kim, K. Y., Lee, Y. H., Chae, C., & Choi, Y. (2010). Presence of *Porphyromonas gingivalis* and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral diseases*, 16(4), 375-381.
30. Mao, S., Park, Y., Hasegawa, Y., Tribble, G. D., James, C. E., Handfield, M., Stavropoulos, M, F., Yilmaz, O & Lamont, R. J. (2007). Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular microbiology*, 9(8), 1997-2007.
31. Kuboniwa, M., Hasegawa, Y., Mao, S., Shizukuishi, S., Amano, A., Lamont, R. J., & Yilmaz, Ö. (2008). *P. gingivalis* accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle. *Microbes and infection*, 10(2), 122-128.
32. Atanasova, K. R., & Yilmaz, Ö. (2014). Looking in the *Porphyromonas gingivalis* cabinet of curiosities: the microbium, the host and cancer association. *Molecular oral microbiology*, 29(2), 55-66.
33. Tampa, M., Mitran, M. I., Mitran, C. I., Sarbu, M. I., Matei, C., Nicolae, I., Caruntu, A., Tocut, M, I., Popa, M, I., Caruntu, C & Georgescu, S. R. (2018). Mediators of inflammation—a potential source of biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Journal of immunology research*, 2018.
34. Zhang, L., Liu, Y., Zheng, H. J., & Zhang, C. P. (2020). The oral microbiota may have influence on oral cancer. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 476-487.

35. McIlvanna, E., Linden, G. J., Craig, S. G., Lundy, F. T., & James, J. A. (2021). *Fusobacterium nucleatum* and oral cancer: a critical review. *BMC cancer*, 21(1), 1-11.
36. Gallimidi, A. B., Fischman, S., Revach, B., Bulvik, R., Maliutina, A., Rubinstein, A. M., Nussbaum, G & Elkin, M. (2015). Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget*, 6(26), 22613.
37. Yilmaz, O., Verbeke, P., Lamont, R. J., & Ojcius, D. M. (2006). Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infection and immunity*, 74(1), 703-710.
38. Fiorillo, L., Cervino, G., Laino, L., D'Amico, C., Mauceri, R., Tozum, T. F., Gaeta, M & Ciccì, M. (2019). *Porphyromonas gingivalis*, periodontal and systemic implications: a systematic review. *Dentistry journal*, 7(4), 114.
39. Gajardo, M., Silva, N., Gómez, L., León, R., Parra, B., Contreras, A., & Gamonal, J. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of periodontology*, 76(2), 289-294.
40. Silva, I. L., & Cascales, E. (2021). Molecular strategies underlying *Porphyromonas gingivalis* virulence. *Journal of Molecular Biology*, 433(7), 166836.
41. Lafuente Ibáñez de Mendoza, I., Maritxalar Mendia, X., Garcia de la Fuente, A. M., Quindos Andres, G., & Aguirre Urizar, J. M. (2020). Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review. *Journal of periodontal research*, 55(1), 13-22.
42. Kawai, T., & Akira, S. (2007, February). TLR signaling. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 1, pp. 24-32). Academic Press.
43. Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 816-825.
44. Kocgozlu, L., Elkaim, R., Tenenbaum, H., & Werner, S. (2009). Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *Journal of dental research*, 88(8), 741-745.
45. Jotwani, R., Moonga, B. S., Gupta, S., & Cutler, C. W. (2010). Nuclear factor- κ B p50 subunits in chronic periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192(1), 278-285.

46. Díaz, L., Hoare, A., Soto, C., Bugue, I., Silva, N., Dutzan, N., Venegas, D., Salinas, D., Pérez-Donoso, J. M., Gamonal, J & Bravo, D. (2015). Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe*, 33, 25-32.
47. Soto, C., Bugueño, I., Hoare, A., Gonzalez, S., Venegas, D., Salinas, D., Melgar-Rodríguez, S., Vernal, R., Gamonal, J., Quest, A, F, G., Pérez-Donoso, J & Bravo, D. (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.
48. Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 262.
49. Zheng, S., Yu, S., Fan, X., Zhang, Y., Sun, Y., Lin, L., Wang, H., Pan, Y & Li, C. (2021). *Porphyromonas gingivalis* survival skills: Immune evasion. *Journal of Periodontal Research*, 56(6), 1007-1018.
50. Hočevár, K., Potempa, J., & Turk, B. (2018). Host cell-surface proteins as substrates of gingipains, the main proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Biological chemistry*, 399(12), 1353-1361.
51. Cai, J., Chen, J., Guo, H., Pan, Y., Zhang, Y., Zhao, W., Li, X & Li, Y. (2019). Recombinant fimbriae protein of *Porphyromonas gingivalis* induces an inflammatory response via the TLR4/NF-κB signaling pathway in human peripheral blood mononuclear cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(3), 1430-1440.
52. Kusumoto, Y., Hirano, H., Saitoh, K., Yamada, S., Takedachi, M., Nozaki, T., Ozawa, Y., Nakahira, Y., Saho, T., Ogo, H., Shimabukuro, Y., Okada, H & Murakami, S. (2004). Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *Journal of periodontology*, 75(3), 370-379.
53. Park, J., Shokeen, B., Haake, S. K., & Lux, R. (2016). Characterization of *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726 adhesins involved in strain-specific attachment to *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Oral Science*, 8(3), 138-144.
54. Brennan, C. A., & Garrett, W. S. (2019). *Fusobacterium nucleatum*—symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 156-166.

55. Zijngge, V., Van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., & M. Harmsen, H. J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*, 5(2), e9321.
56. Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T. J., Kinder Haake, S., Park, N. H., Kuramitsu, H., & Genco, R. J. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infection and immunity*, 68(6), 3140-3146.
57. Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., & Moore, L. V. (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infection and immunity*, 57(10), 3194-3203.
58. Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Shimma, S., Alghamdi, S. A., Mayumi, S., Lamont, R. J., Fukusaki, E & Amano, A. (2022). *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. *Msystems*, 7(4), e00170-22.
59. Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., & Whiteley, M. (2014). Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio*, 5(2), e01012-14.
60. De Andrade, K. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., & Coutinho-Silva, R. (2019). Immunological pathways triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: therapeutic possibilities?. *Mediators of inflammation*, 2019.
61. Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R., Weinberg, A., Darveau, R. P., Bainbridge, B. W., & Dale, B. A. (2000). Inducible expression of human β -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infection and immunity*, 68(5), 2907-2915.
62. Grenier, D., & Grignon, L. (2006). Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum* lipopolysaccharide. *Oral microbiology and immunology*, 21(3), 190-196.
63. Yang, Y., Weng, W., Peng, J., Hong, L., Yang, L., Toiyama, Y., Gao, R., Liu, M., Yin, M., Pan, C., Li, H., Guo, B., Zhu, Q., Wei, Q., Moyer, M., Wang, P., Cai, S., Goel, A., Qin, H & Ma, Y. (2017). *Fusobacterium nucleatum* increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by

activating toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor- κ B, and up-regulating expression of microRNA-21. *Gastroenterology*, 152(4), 851-866.

64. Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*, 5(6), 580-592.
65. Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), 195-206.
66. Groeger, S., Zhou, Y., Ruf, S., & Meyle, J. (2022). Pathogenic Mechanisms of *Fusobacterium nucleatum* on Oral Epithelial Cells. *Frontiers in Oral Health*, 3.
67. Takahashi, N., Saito, K., Schachtele, C. F., & Yamada, T. (1997). Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral microbiology and immunology*, 12(6), 323-328.
68. Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K., & Allison, C. (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and immunity*, 66(10), 4729-4732.
69. Yoshioka, H., Yoshimura, A., Kaneko, T., Golenbock, D. T., & Hara, Y. (2008). Analysis of the activity to induce Toll-like receptor (TLR) 2-and TLR4-mediated stimulation of supragingival plaque. *Journal of periodontology*, 79(5), 920-928.
70. Kuboniwa, M., Hendrickson, E. L., Xia, Q., Wang, T., Xie, H., Hackett, M., & Lamont, R. J. (2009). Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC microbiology*, 9(1), 1-14.
71. Al-Qutub, M. N., Braham, P. H., Karimi-Naser, L. M., Liu, X., Genco, C. A., & Darveau, R. P. (2006). Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 74(8), 4474-4485.
72. Saito, A., Inagaki, S., Kimizuka, R., Okuda, K., Hosaka, Y., Nakagawa, T., & Ishihara, K. (2008). *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54(3), 349-355.
73. Saito, A., Kokubu, E., Inagaki, S., Imamura, K., Kita, D., Lamont, R. J., & Ishihara, K. (2012). *Porphyromonas gingivalis* entry into gingival epithelial cells modulated

by *Fusobacterium nucleatum* is dependent on lipid rafts. *Microbial pathogenesis*, 53(5-6), 234-242.

74. Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E. I., & Hourihaddad, Y. (2009). Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *Journal of clinical periodontology*, 36(5), 406-410.
75. Gallimidi, A. B., Fischman, S., Revach, B., Bulvik, R., Maliutina, A., Rubinstein, A. M., Nussbaum, G & Elkin, M. (2015). Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget*, 6(26), 22613.
76. Mountcastle, S. E., Cox, S. C., Sammons, R. L., Jabbari, S., Shelton, R. M., & Kuehne, S. A. (2020). A review of coculture models to study the oral microenvironment and disease. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1773122.
77. Saito, Y., Fujii, R., Nakagawa, K. I., Kuramitsu, H. K., Okuda, K., & Ishihara, K. (2008). Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology*, 23(1), 1-6.
78. Lee, S. H., & Baek, D. H. (2013). Characteristics of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in co-culture with *Fusobacterium nucleatum*. *Molecular oral microbiology*, 28(3), 230-238.
79. Ramadan, D. E., Hariyani, N., Indrawati, R., Ridwan, R. D., & Diyatri, I. (2020). Cytokines and chemokines in periodontitis. *European journal of dentistry*, 14(03), 483-495.
80. Graves, D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*, 79, 1585-1591.
81. Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*, 89(12), 1349-1363.
82. Tang, D., Tao, D., Fang, Y., Deng, C., Xu, Q., & Zhou, J. (2017). TNF-alpha promotes invasion and metastasis via NF-kappa B pathway in oral squamous cell carcinoma. *Medical science monitor basic research*, 23, 141.
83. Unus, S., Ramabadran, S., Lakshmi, P., Gunasekaran, N., & Krishnan, R. (2014). Role of cytokines in oral malignancies. *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, 5(4), 274.
84. Irwin, C. R., & Myrillas, T. T. (1998). The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral diseases*, 4(1), 43-47.

85. Sahibzada, H. A., Khurshid, Z., Sannam Khan, R., Naseem, M., Mahmood Siddique, K., Mali, M., & Zafar, M. S. (2017). Salivary IL-8, IL-6 and TNF- α as potential diagnostic biomarkers for oral cancer. *Diagnostics*, 7(2), 21.
86. Waugh, D. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research*, 14(21), 6735-6741.
87. O'Toole, S. A., Sheppard, B. L., McGuinness, E. P., Gleeson, N. C., Yoneda, M., & Bonnar, J. (2003). The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detection and Prevention*, 27(1), 47-54.
88. Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
89. Décanis, N., Savignac, K., & Rouabhia, M. (2009). Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human β -defensin 2 production. *Cytokine*, 45(2), 132-140.
90. Tan, K. H., Seers, C. A., Dashper, S. G., Mitchell, H. L., Pyke, J. S., Meuric, V., Slakeski, N., Cleal, S. M., Chambers, J. L., McConville, M. J & Reynolds, E. C. (2014). *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* exhibit metabolic symbioses. *PLoS pathogens*, 10(3), e1003955.
91. Lin, C. W., Hsieh, Y. S., Hsin, C. H., Su, C. W., Lin, C. H., Wei, L. H., Yang, S. F & Chien, M. H. (2012). Effects of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms on susceptibility to environmental factors and the clinicopathologic development of oral cancer. *PloS one*, 7(4), e35078.
92. Ibeagha-Awemu, E., Lee, J. W., Ibeagha, A., Bannerman, D., Paape, M., & Zhao, X. (2008). Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary research*, 39(2), 1-12.
93. Liu, H., Xiong, J., He, T., Xiao, T., Li, Y., Yu, Y., Huang, Y., Xu, X., Huang, Y., Zhang, J., Zhang, B & Zhao, J. (2017). High uric acid-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via the TLR4/NF-kB signaling pathway. *American Journal of Nephrology*, 46(4), 333-342.
94. Okuda, T., Kokubu, E., Kawana, T., Saito, A., Okuda, K., & Ishihara, K. (2012). Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella* species. *Anaerobe*, 18(1), 110-116.
95. Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., & Frossard, N. (2009). Ser276 phosphorylation of NF-kB p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PloS one*, 4(2), e4393.

96. Sugawara, Y., Uehara, A., Fujimoto, Y., Kusumoto, S., Fukase, K., Shibata, K., Sugawara, S., Sasano, T & Takada, H. (2006). Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *Journal of dental research*, 85(6), 524-529.
97. Bosshardt, D. D. (2018). The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontology 2000*, 76(1), 43-50.
98. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97, 4-27.
99. Stossel, T. P. (1974). Phagocytosis. *New England Journal of Medicine*, 290(13), 717-723.
100. Ulkur, F., Arun, T., & Ozdemir, F. (2013). The effects of three different mouth rinses in a 4-day supragingival plaque regrowth study. *European journal of dentistry*, 7(03), 352-358.
101. Engelkirk, P. G., & Duben-Engelkirk, J. (2010). *Burton's Microbiology for the Health Sciences* (9.^a ed.). Jones & Bartlett Learning.
102. Bramanti, T. E., & Holt, S. C. (1991). Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Journal of bacteriology*, 173(22), 7330-7339.
103. Robrish, S. A., Oliver, C., & Thompson, J. (1987). Amino acid-dependent transport of sugars by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. *Journal of bacteriology*, 169(9), 3891-3897.
104. Soto, C., Rojas, V., Yáñez, L., Hidalgo, A., Olivera, M., Pacheco, M., Venegas, D., Salinas, D., Bravo, D & Quest, A. F. (2022). *Porphyromonas gingivalis-Helicobacter pylori* co-incubation enhances *Porphyromonas gingivalis* virulence and increases migration of infected human oral keratinocytes. *Journal of Oral Microbiology*, 14(1), 2107691.
105. Fujita, T., Yoshimoto, T., Matsuda, S., Kajiya, M., Kittaka, M., Imai, H., Iwata, T., Uchida, Y., Shiba, H & Kurihara, H. (2015). Interleukin-8 induces DNA synthesis, migration and down-regulation of cleaved caspase-3 in cultured human gingival epithelial cells. *Journal of Periodontal Research*, 50(4), 479-485.
106. Pan, C., Xu, X., Tan, L., Lin, L., & Pan, Y. (2014). The effects of *Porphyromonas gingivalis* on the cell cycle progression of human gingival epithelial cells. *Oral diseases*, 20(1), 100-108.
107. Langjahr, P., Diaz-Jimenez, D., De la Fuente, M., Rubio, E., Golenbock, D., Bronfman, F. C., Quera, R., Gonzalez, M, J & Hermoso, M. A. (2014). Metalloproteinase-dependent TLR2 ectodomain shedding is involved in soluble toll-like receptor 2 (sTLR2) production. *PloS one*, 9(12), e104624.

108. Verstak, B., Nagpal, K., Bottomley, S. P., Golenbock, D. T., Hertzog, P. J., & Mansell, A. (2009). MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2-and TLR4-mediated NF- κ B proinflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24192-24203.
109. Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., Hays, J. P., van Pelt-Verkuil, E., & van Belkum, A. (2010). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Publishing.
110. Chavarría-Velázquez, C. O., Torres-Martínez, A. C., Montaña, L. F., & Rendón-Huerta, E. P. (2018). TLR2 activation induced by *H. pylori* LPS promotes the differential expression of claudin-4,-6,-7 and-9 via either STAT3 and ERK1/2 in AGS cells. *Immunobiology*, 223(1), 38-48.
111. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.
112. Bretones, G., Delgado, M. D., & León, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 506-516.
113. Zhou, J., Tao, D., Xu, Q., Gao, Z., & Tang, D. (2015). Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(3), 3150.
114. Larramendy, M. L., & Solonesky, S. S. (2018). *Genotoxicity: A Predictable Risk to Our Actual World*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
115. Liu, F., Wang, Y., Xu, J., Liu, F., Hu, R., & Deng, H. (2016). Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the expression of key genes involved in cholesterol metabolism in macrophages. *Archives of Medical Science*, 12(5), 959-967.
116. Chen, T., Li, Q., Wu, J., Wu, Y., Peng, W., Li, H., Wang, J., Tang, X., Peng, Y & Fu, X. (2018). *Fusobacterium nucleatum* promotes M2 polarization of macrophages in the microenvironment of colorectal tumours via a TLR4-dependent mechanism. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67, 1635-1646.
117. Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews cancer*, 9(11), 798-809.

