



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**Rol de la cápsula extracelular en la inmunogenicidad y virulencia de
Porphyromonas gingivalis durante la periodontitis**

Francisca Alejandra Castillo Pérez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Denisse Bravo Rodríguez

TUTOR EXPERTO

Dr. Gustavo Monasterio Ocares

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1181780

Santiago - Chile

2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**Rol de la cápsula extracelular en la inmunogenicidad y virulencia de
Porphyromonas gingivalis durante la periodontitis**

Francisca Alejandra Castillo Pérez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dra. Denisse Bravo Rodríguez

TUTOR EXPERTO

Dr. Gustavo Monasterio Ocares

Adscrito a Proyecto Fondecyt 1181780

Santiago - Chile

2019

DEDICATORIA

A mis padres Alejandra y Miguel:

Por su amor, sus valores, su apoyo incondicional y motivación constante. No tengo palabras para expresar la gratitud que les tengo por haber dedicado sus 28 años de matrimonio a entregarnos a mis hermanos y a mí las herramientas que nos han permitido desarrollarnos durante la vida y ser personas de bien. Todo lo que soy hoy en día se los debo a ustedes.

A mis hermanos Catalina y José Miguel:

Me enseñaron la responsabilidad de ser una hermana mayor y un ejemplo a seguir para ustedes. Gracias por los mejores recuerdos de infancia que podría tener, por las risas, las peleas y los momentos de apoyo y confianza. Cuentan conmigo para siempre.

A mis abuelos Juan, María, Orlando y Patricia:

Pese a la distancia y ausencia física siempre los llevo en mi corazón. Con mucho cariño les dedico esta tesis en honor a los bellos recuerdos y enseñanzas que me entregaron durante mi niñez.

A Gustavo:

Por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva y por instarme a conocer el mundo de la ciencia y la investigación en odontología. Gracias por creer en mis capacidades y por tus sabios consejos. Siempre has estado presente durante este difícil y largo proceso de pregrado para apoyarme, orientarme y alentarme a seguir adelante. Y por sobre todo, gracias por tu amor y tu cariño. Eres el mejor compañero que la vida pudo poner en mi camino.

A la familia Monasterio-Ocares:

A Don Keno, la Sra. María Angélica, Carol y Luis. Desde que los conocí me han acogido en su cálido hogar como si fuera una hija más, haciéndome sentir en familia. Les estoy inmensamente agradecida a cada uno de ustedes por todo el apoyo y cariño que me han brindado durante mis años en la universidad.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis tutores Rolando Vernal y Denisse Bravo por brindarme todo su apoyo para el desarrollo de este trabajo. Muchísimas gracias por el tiempo que han dedicado en la corrección de esta tesis, por la buena disposición que siempre han tenido para orientarme en su redacción y por confiar en mis habilidades. Además, quisiera expresar mi particular gratitud al profesor Rolando por permitirme participar del laboratorio de Biología Periodontal, instancia que me ha permitido acercarme a la investigación en odontología, adquirir nuevas experiencias y conocimientos como también conocer personas maravillosas.

A los integrantes del laboratorio de Biología Periodontal y del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología: a Bernardita, Jesica, Leticia, Carla, Claudia, Darna, Daniela, Baltazar y Emilio. Muchísimas gracias por su contribución en el desarrollo de esta tesis y por todos los conocimientos y aprendizajes compartidos durante mi participación en el laboratorio. Les agradezco también por la valiosa amistad y los gratos momentos vividos durante este tiempo, hicieron de mi paso por la universidad una instancia mucho más grata.

Finalmente, quisiera agradecer a la Universidad de Chile y a los profesores de la Facultad de Odontología por entregarme las herramientas que me han permitido formarme como Cirujana Dentista de la mejor institución de educación superior del país.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
Periodontitis	8
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8
Serotipos capsulares de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
Respuesta inmune durante la periodontitis	11
Rol de los linfocitos Th1 y Th17 durante la periodontitis	13
Resorción ósea periodontal	14
Planteamiento del problema científico	15
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVO GENERAL	18
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
Cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	19
Animales de experimentación	20
Infección periodontal	20
Muestras biológicas	20
Cuantificación de la resorción ósea alveolar mediante μ CT y SEM	21
Detección de osteoclastos TRAP ⁺	22
Cuantificación de citoquinas y RANKL mediante qPCR	22
Detección de Linfocitos Th1 y Th17 mediante citometría de flujo	24
Análisis de datos	25
7. RESULTADOS	26
Resorción ósea periodontal	26
Detección de osteoclastos TRAP ⁺ en las lesiones periodontales	28
Expresión de citoquinas en las lesiones periodontales	29
Expresión de RANKL en las lesiones periodontales	30
Correlación entre los niveles de expresión de citoquinas y RANKL	31
Detección de linfocitos Th1 y Th17 en linfonodos cervicales	31
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIONES	41
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
11. ANEXOS	52

1. RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica cuya etiología se atribuye a la disbiosis de la placa bacteriana subgingival y que se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dentario. *Porphyromonas gingivalis* es un periodontopatógeno de la placa bacteriana subgingival, considerado clave en la etiología de la periodontitis. Entre sus factores de virulencia, la cápsula extracelular posee un rol fundamental en la etiopatogenia de esta enfermedad ya que modula la respuesta inmune del hospedero. Sobre la base de la antigenicidad de los distintos polisacáridos que constituyen la cápsula extracelular de esta bacteria, se describen siete serotipos diferentes (K1-K7). Entre ellos, el serotipo K1 posee un mayor potencial inmunogénico. En diversos modelos animales, se ha estudiado la patogenicidad de la cápsula extracelular de *P. gingivalis*; sin embargo, estos modelos involucraron la comparación entre cepas de *P. gingivalis* genéticamente distintas y la generación de lesiones en tejidos no periodontales. El objetivo del presente trabajo de investigación fue analizar el rol de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* en un modelo murino de periodontitis, mediante la determinación de los niveles de respuesta inmune local tipo Th1 y Th17, la actividad osteoclástica y la resorción ósea alveolar. Para esto, se analizaron lesiones periodontales experimentales inducidas con la cepa W50 tipo silvestre de *P. gingivalis*, perteneciente al serotipo K1, y sus mutantes isogénicas GPA Δ PG0116-PG0120 y GPC Δ PG0109-PG0118 carentes de cápsula extracelular. En las lesiones periodontales experimentales, ambas cepas capsulares mutantes de *P. gingivalis* indujeron menor resorción ósea alveolar en comparación a la cepa silvestre. Esta menor pérdida ósea se asoció a una disminución en la expresión de citoquinas de los perfiles linfocitarios Th1 y Th17, una menor detección de linfocitos Th1 y Th17, una menor expresión de RANKL y una disminución en el número de osteoclastos en las lesiones periodontales. En conjunto, estos datos permiten concluir que la cápsula extracelular de *P. gingivalis* participa en la resorción ósea alveolar periodontal durante la periodontitis, y que esta pérdida ósea se asocia con un patrón de respuesta inmune local tipo Th1 y Th17.

2. INTRODUCCIÓN

Periodontitis

La periodontitis es una patología crónica de carácter inflamatorio, cuya etiología principal se atribuye a la disbiosis de la placa bacteriana subgingival y el consiguiente desequilibrio con la respuesta inmune del hospedero. Se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte dentario que lleva a la pérdida de los dientes (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012; Papapanou y cols., 2018).

Los microorganismos de la placa bacteriana subgingival desempeñan un rol fundamental en el inicio y progresión de la enfermedad; no obstante, es la respuesta inmune del hospedero desplegada ante estos microorganismos la principal causa de la destrucción tisular (Sorsa y cols., 2011; Meyle y Chapple, 2015). Al respecto, la periodontitis se considera una enfermedad polimicrobiana, en la que ciertos microorganismos claves como *Porphyromonas gingivalis* pueden modular la respuesta inmune del hospedero y promover un desbalance ecológico conocido como disbiosis, que involucra un incremento en la abundancia relativa de bacterias patogénicas e inflamofílicas de la placa bacteriana (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012; Hajishengallis, 2014). Durante esta disbiosis, ciertos factores de virulencia de los microorganismos, tal como la cápsula extracelular de *P. gingivalis*, pueden actuar como inmunógenos responsables de la activación de la respuesta inmuno-inflamatoria y osteodestructiva periodontal (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012; Sanz y cols., 2017).

Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis es un periodontopatógeno asociado a la placa bacteriana subgingival, clave en el inicio y progresión de la periodontitis (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012; How y cols., 2016). Corresponde a un cocobacilo Gram-negativo, pequeño, no móvil, anaerobio estricto y asacarolítico, miembro del género *Porphyromonas* que pertenece a la familia *Bacteroidaceae* (Holt y cols., 1999; How y cols., 2016).

Su hábitat natural es la cavidad oral en los humanos y otros mamíferos (Beem y cols., 1991; Eke y cols., 1993; Asikainen y Chen, 1999). En humanos, *P. gingivalis* coloniza diversos microambientes orales, incluyendo la placa bacteriana supra y subgingival, las mucosas orales de revestimiento y el dorso de la lengua (Asikainen y cols., 1999). Si bien se aísla principalmente de pacientes con periodontitis (Saremi y cols., 2005; Faghri y cols., 2007; Tomita y cols., 2013; How y cols., 2016), puede identificarse también en la placa bacteriana de los individuos sanos (Slots y Ting, 1999; Gafan y cols., 2004). Además, *P. gingivalis* puede colonizar varios ambientes extraorales, tales como las válvulas cardíacas, las arterias, el estómago, el cerebro, la placenta y el cordón umbilical (Stelzel y cols., 2002; Nakano y cols., 2008; Poole y cols., 2013; Oliveira y cols., 2015; Pataro y cols., 2016; Vanterpool y cols., 2016). Por otro lado, *P. gingivalis* también se asocia a la patogenia de otras enfermedades y condiciones, tales como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, diabetes mellitus tipo II, parto prematuro y bajo peso del neonato (Offenbacher y cols., 2001; Meurman y cols., 2004; Saremi y cols., 2005; Friedewald y cols., 2009; Singhrao y cols., 2015).

La patogenicidad de *P. gingivalis* se atribuye a diversos factores de virulencia que expresa, entre ellos, las gingipaínas, las sialidasas, el lipopolisacárido, la fimbria y la cápsula extracelular (Lamont y Jenkinson, 1998). Las macromoléculas de la superficie bacteriana confieren estabilidad estructural y son importantes para el reconocimiento e interacción con otras bacterias y con el medio extracelular (Aduse-Opoku y cols., 2006). En microorganismos patobiontes, las macromoléculas de superficie también constituyen una barrera de defensa y evasión de la respuesta inmune del hospedero (Holt y cols., 1999). En este sentido, los polisacáridos de la cápsula extracelular representan un conjunto de macromoléculas de superficie que pueden contribuir a estas propiedades en diversas bacterias Gram-negativas (Whitfield y Roberts, 1999; Aduse-Opoku y cols., 2006). En efecto, la cápsula extracelular de *P. gingivalis* le proporciona un mecanismo de adhesión e invasión a los tejidos del hospedero (Schifferle y cols., 1989; Holt y cols., 1999; Jiao y cols., 2014; How y cols., 2016; Xu y cols., 2017).

Además, le permite interactuar con diversos componentes del sistema inmune y, así, inducir la respuesta pro-inflamatoria y osteodestructiva característica de la periodontitis (Schifferle y cols., 1989; Holt y cols., 1999; Jiao y cols., 2014; How y cols., 2016; Xu y cols., 2017).

Serotipos capsulares de *Porphyromonas gingivalis*

Sobre la base de la antigenicidad de los polisacáridos capsulares (K), se describen siete serotipos de *P. gingivalis* diferentes, denominados K1, K2, K3, K4, K5, K6 y K7 (Grenier y McBride, 1987; Neiders y cols., 1989; van Winkelhoff y cols., 1993; Laine y cols., 1996; Laine y van Winkelhoff, 1998). En términos generales, estos serotipos capsulares presentan una mayor virulencia en comparación a cepas bacterianas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular (Grenier y Mayrand, 1987; Neiders y cols., 1989; Laine y cols., 1998); sin embargo, el rol de la variación de la estructura de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* en la virulencia de este microorganismo aún no se comprende del todo.

Diversos estudios han intentado dilucidar esta interrogante; por ejemplo, en macrófagos peritoneales estimulados con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*, se detectaron mayores niveles de expresión de las quimioquinas CCL2, CCL5, CXCL1 y CXCL2 en presencia del serotipo K1 en comparación a los otros serotipos bacterianos (d'Empaire y cols., 2006). Por otro lado, en células dendríticas humanas, se observó que el serotipo K1 induce un aumento en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias interleuquina (IL)-1 β , IL-6, IL-12, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TNF- β , en comparación a los otros serotipos capsulares (Vernal y cols., 2009). Además, en linfocitos T humanos estimulados con células dendríticas autólogas expuestas al serotipo K1 de *P. gingivalis*, se observó un aumento en los niveles de secreción de citoquinas y factores de transcripción asociados a los perfiles linfocitarios Th1 y Th17, junto con mayores niveles del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) y una mayor expresión del marcador fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), específico de osteoclastos (Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014). Estos

antecedentes demuestran que el serotipo K1 de *P. gingivalis* presenta un mayor potencial inmunogénico en comparación a los otros y, por lo tanto, que la cápsula extracelular de *P. gingivalis* podría ser un factor de virulencia importante en la patogénesis de la periodontitis.

Así, las diferencias en el potencial inmunogénico entre los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* podrían atribuirse, al menos en parte, a las variaciones en la composición estructural de la cápsula extracelular (Vernal y cols., 2009; Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014; Vernal, Diaz-Zuniga, y cols., 2014). Al respecto, se ha descrito que la cápsula extracelular de la cepa W50 de *P. gingivalis*, perteneciente al serotipo K1, se compone de ácido manurónico, ácido glucurónico, ácido galacturónico, galactosa y N-acetilglucosamina, composición que difiere a la del resto de los serotipos capsulares (Schifferle y cols., 1989; Farquharson y cols., 2000).

Respuesta inmune durante la periodontitis

Durante la periodontitis, la activación de la respuesta inmune del hospedero requiere de la capacidad de reconocer los antígenos microbianos por parte de células del sistema inmune. Como células presentadoras de antígenos profesionales, las células de Langerhans del epitelio gingival y las células dendríticas dermales del tejido conectivo gingival reconocen a los microorganismos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés pathogen recognizing patterns), los cuales identifican patrones moleculares microbianos altamente conservados (PAMPs, del inglés pathogen-associated molecular patterns) presentes en las bacterias (Azuma, 2006). Entre los PRRs, los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés toll-like receptors) son los receptores más estudiados (Azuma, 2006). Los TLRs pueden identificar una amplia diversidad de PAMPs, entre los cuales se encuentran los polisacáridos de la cápsula extracelular de *P. gingivalis*, que pueden ser reconocidos principalmente por TLR2 y TLR4 (Díaz-Zúñiga y cols., 2015). Al respecto, en células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* se detectó un incremento en los

niveles de expresión de TLR2 y TLR4, y se demostró que la señalización mediada por TLR4 es sensible a las variaciones estructurales que definen los distintos serotipos bacterianos (Díaz-Zúñiga y cols., 2015).

Posterior al reconocimiento antigénico, las células presentadoras de antígeno fagocitan las bacterias periodontopatógenas y procesan sus antígenos, conjugándolos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés major histocompatibility complex) clase II. Luego, migran hacia los linfonodos que drenan los tejidos periodontales para presentar los antígenos bacterianos a los linfocitos TCD4⁺ *naïve* (Azuma, 2006; Cutler y Teng, 2007). Durante este proceso, los linfocitos TCD4⁺ *naïve* identifican el antígeno conjugado al MHC clase II mediante su receptor específico de linfocito T (TCR, del inglés T cell receptor), al mismo tiempo que las células presentadoras de antígeno maduras secretan citoquinas específicas y expresan moléculas co-estimuladoras, fundamentales para la activación y polarización de los linfocitos T (Cutler y Jotwani, 2004; Azuma, 2006). En conjunto, todos estos eventos determinan que los linfocitos TCD4⁺ *naïve* se activen, proliferen y polaricen selectivamente en distintos fenotipos funcionales: linfocitos T colaboradores (Th, del inglés T-helper) tipo Th1, Th2, Th17 o linfocitos T reguladores (Tregs). Cada fenotipo linfocitario se define por la expresión de un factor de transcripción master-switch particular y la secreción de un perfil de citoquinas específico que determina su función (**Tabla 1**) (Neiders y cols., 1989; Abbas y cols., 1996; Bluestone y Abbas, 2003; Harrington y cols., 2006; Reiner, 2007; Stockinger y Veldhoen, 2007; Vernal y García-Sanz, 2008; Trifari y cols., 2009; Akdis y cols., 2012; Jabeen y Kaplan, 2012; Kato-Kogoe y cols., 2012; Aranha y cols., 2013).

Tabla 1. Factores de transcripción, citoquinas y función general periodontal de los distintos fenotipos de linfocitos T CD4⁺.

Fenotipo efector	Factor de transcripción	Citoquinas	Función
Th1	<i>T-bet</i>	IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α , TNF- β	Pro-inflamatoria
Th2	<i>GATA3</i>	IL-4, IL-5, IL-13	Anti-inflamatoria
Th17	<i>RORC2 (RORγt)</i>	IL-6, IL-17A, IL-21, IL-23, RANKL	Pro-inflamatoria y osteodestructiva
Treg	<i>Foxp3</i>	IL-10, TGF- β 1	Inmuno-reguladora

Rol de los linfocitos Th1 y Th17 durante la periodontitis

Los linfocitos T cumplen un rol central en la respuesta inmuno-inflamatoria y osteodestructiva desarrollada en los tejidos periodontales en respuesta a las bacterias periodontopatógenas (Gemmell y cols., 2007). En este contexto, el fenotipo linfocitario y el perfil de citoquinas secretadas en el sitio de inflamación son determinantes claves en el inicio y progresión de esta enfermedad (Gemmell y cols., 2007; Hourri-Haddad y cols., 2007; Garlet, 2010; Graves y cols., 2011). Es así como en los tejidos periodontales afectados de periodontitis se describe un predominio del patrón de respuesta linfocitario tipo Th1 y Th17 (Baker y cols., 1999; Takahashi y cols., 2005; Vernal y cols., 2005; Vernal y García-Sanz, 2008; Dutzan y cols., 2009).

En términos generales, los linfocitos Th17 se asocian con enfermedades osteodestructivas de carácter crónico, y en las lesiones periodontales se ha observado un incremento en la presencia de este fenotipo linfocitario, reflejado en un aumento en la expresión de su factor de transcripción específico *RORC2* y sus citoquinas características IL-6, IL-17A, IL-21 e IL-23 (Cardoso y cols., 2009; Moutsopoulos y cols., 2014; Zenobia y Hajishengallis, 2015).

Por otro lado, RANKL cumple un rol fundamental en el mecanismo de regulación fisiológico y patológico de la resorción ósea (Leibbrandt y Penninger,

2008; Garlet, 2010) y se ha establecido que los linfocitos Th17 inducen la osteoclastogénesis y la consecuente resorción ósea alveolar periodontal mediante la producción directa de RANKL (Yasuda y cols., 1998; Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Vernal y García-Sanz, 2008; Cheng y cols., 2014). Además, los linfocitos Th17 también inducen indirectamente la producción de RANKL, a través de la secreción de IL-17A y posterior activación de células productoras de RANKL, entre otras, osteoblastos, fibroblastos y macrófagos (Boyle y cols., 2003; Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Di Benedetto y cols., 2013; Cheng y cols., 2014).

Los linfocitos Th1 se asocian a la inflamación periodontal (Baker y cols., 1999; Garlet, 2010). Durante la periodontitis, existe un incremento en la expresión del factor de transcripción específico *T-bet* y de las citoquinas características de este fenotipo linfocitario: IFN- γ , IL-1 β , IL-12 y TNF- α (Ebersole y Taubman, 1994; Garlet y cols., 2003; Dutzan y cols., 2009; Garlet, 2010).

Resorción ósea periodontal

La remodelación del tejido óseo depende del equilibrio entre la resorción y formación ósea mediada por osteoclastos y osteoblastos, respectivamente (Boyle y cols., 2003). Durante la periodontitis, existe un desequilibrio que favorece los procesos de resorción ósea alveolar debido a un aumento en la actividad de los osteoclastos. El mecanismo molecular que subyace a este proceso de regulación del metabolismo óseo obedece al eje compuesto por RANKL y su receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), así como también osteoprotegerina (OPG), inhibidor natural de la unión RANKL/RANK, conocido como eje RANKL/RANK/OPG (Boyle y cols., 2003; Belibasakis y Bostanci, 2012).

En condiciones fisiológicas, la osteoclastogénesis y la resorción ósea son reguladas por RANKL, ligando que se une a su receptor RANK presente en la superficie de las células precursoras de osteoclastos, lo que favorece su diferenciación hacia osteoclastos maduros (Boyle y cols., 2003). La función de RANKL puede ser bloqueada por su inhibidor biológico OPG, un receptor soluble con homología estructural a RANK y mayor afinidad por RANKL (Boyle y cols.,

2003). La unión de RANKL a OPG evita la interacción de este ligando con su receptor RANK, lo cual finalmente inhibe la diferenciación de osteoclastos y la consecuente resorción ósea (Boyle y cols., 2003; Belibasakis y cols., 2012).

Las bacterias periodontopatógenas desempeñan un rol importante en la inducción de la resorción ósea alveolar durante la periodontitis (Belibasakis y cols., 2011; Belibasakis y cols., 2012). En particular, en modelos murinos de periodontitis, *P. gingivalis* se asocia a un aumento en los niveles de RANKL y la resorción ósea alveolar (Han y cols., 2013; Lin y cols., 2014). Mientras que la presencia de *P. gingivalis* en la placa bacteriana subgingival de pacientes con periodontitis crónica también se relaciona positivamente con los niveles de expresión de RANKL periodontal (Wara-aswapati y cols., 2007; Sakellari y cols., 2008). Asimismo, se ha descrito que los diferentes serotipos capsulares de *P. gingivalis* son de gran importancia en la patogénesis de la periodontitis, ya que potencian una mayor resorción ósea *in vivo*. Específicamente, los serotipos K1 y K2 se asocian a un aumento en la producción de RANKL y osteoclastos TRAP⁺ (Vernal, Diaz-Zuniga, y cols., 2014).

Planteamiento del problema científico

La patogenicidad de *P. gingivalis* se atribuye a sus factores de virulencia, entre ellos, a su cápsula extracelular. Sobre la base de las variaciones estructurales de los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis*, se han descrito distintos serotipos bacterianos (van Winkelhoff y cols., 1993; Laine y cols., 1996), los cuales han sido analizados en estudios *in vitro* en relación a la activación de la respuesta inmune en macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, y se ha demostrado que el serotipo K1 induce un mayor patrón de respuesta tipo Th1 y Th17 en comparación a los otros serotipos capsulares (d'Empaire y cols., 2006; Vernal y cols., 2009; Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014). Asimismo, el serotipo K1 de *P. gingivalis* estimula una mayor diferenciación y activación de osteoclastos mediada por RANKL *in vitro* y este incremento fue significativamente mayor en comparación a los estimulados por los otros serotipos bacterianos.

En modelos animales, se ha demostrado la patogenicidad de la cápsula extracelular de *P. gingivalis*; sin embargo, estos modelos involucraron la comparación entre cepas de *P. gingivalis* genéticamente distintas y la generación de lesiones en tejidos no periodontales (P. B. Chen y cols., 1987; Grenier y Mayrand, 1987; Van Steenberghe y cols., 1987; Neiders y cols., 1989; Kesavalu y cols., 1992; Ebersole y cols., 1995; Laine y cols., 1998). La limitante de utilizar cepas bacterianas genéticamente diferentes es que los efectos que se atribuyen a los distintos serotipos capsulares pueden ser en realidad una consecuencia de estas diferencias genéticas y no necesariamente del efecto que pueden tener las diferencias estructurales e inmunogénicas de la cápsula extracelular. Además, las lesiones generadas en tejidos no periodontales no son homologables con las lesiones periodontales, dado las características estructurales y funcionales propias de los tejidos de soporte de los dientes. En consecuencia, la novedad del presente estudio radica en dos aspectos principales: (1) la utilización de una cepa bacteriana capsular silvestre y dos mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular y (2) la generación de lesiones periodontales *in vivo*, utilizando un modelo validado de periodontitis.

En este sentido, la identificación y caracterización del locus del polisacárido capsular (antígeno K) de *P. gingivalis* permitió la obtención de mutantes isogénicas de la cepa W50 (serotipo K1) carentes de cápsula extracelular (Aduse-Opoku y cols., 2006), las cuales fueron utilizadas en este estudio. Trabajos realizados con mutantes isogénicas de la cepa W50 carentes de cápsula extracelular (PgC Δ PG0117-PG0120), similares a las obtenidas por Aduse-Opoku y cols., han demostrado que la ausencia de la cápsula extracelular modifica la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en fibroblastos y macrófagos (Brunner, Scheres, y cols., 2010; Singh y cols., 2011), afectando la virulencia de *P. gingivalis in vitro*. Sin embargo, los efectos que pueda tener la ausencia de la cápsula extracelular en el serotipo K1 de *P. gingivalis* no se ha analizado desde el punto de vista de su inmunogenicidad y virulencia *in vivo*.

Sobre la base de los antecedentes planteados, es posible especular que la cápsula extracelular del serotipo K1 de *P. gingivalis* podría inducir lesiones

periodontales más severas, caracterizadas por presentar una mayor resorción ósea alveolar en los animales infectados. Además, este aumento en los niveles de resorción ósea alveolar podría asociarse a un incremento en la respuesta inmune local tipo Th1 y Th17, y a una mayor actividad de osteoclastos. En este contexto, las mutantes del serotipo K1 de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular evidenciarían una menor inmunogenicidad y virulencia en infecciones experimentales, con menores niveles de resorción ósea alveolar asociada a una disminución en la respuesta inmune local tipo Th1 y Th17, y a una menor actividad osteoclástica.

3. HIPÓTESIS

La ausencia de la cápsula extracelular de *Porphyromonas gingivalis* serotipo K1 produce lesiones periodontales con menor resorción ósea alveolar, respuesta inmune local tipo Th1 y Th17 y actividad osteoclástica *in vivo*.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de respuesta inmune local tipo Th1 y Th17, actividad de osteoclastos y resorción ósea alveolar en lesiones periodontales experimentales inducidas con *Porphyromonas gingivalis* serotipo K1 silvestre y mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de citoquinas tipo Th1 y Th17 y RANKL en lesiones periodontales experimentales inducidas con *Porphyromonas gingivalis* serotipo K1 silvestre o mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular.

2. Cuantificar el número de los linfocitos Th1 y Th17 presentes en los linfonodos cervicales de animales con lesiones periodontales experimentales inducidas con *Porphyromonas gingivalis* serotipo K1 silvestre o mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular.

3. Cuantificar los niveles de resorción ósea alveolar y actividad osteoclástica en lesiones periodontales experimentales inducidas con *Porphyromonas gingivalis* serotipo K1 silvestre o mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Porphyromonas gingivalis*

Las cepas capsulares de *P. gingivalis* W50 (serotipo K1) y sus mutantes isotípicas no capsulares (GPA Δ PG0116-PG0120 y GPC Δ PG0109-PG0118) (Aduse-Opoku y cols., 2006) fueron cultivadas en medio de agar sangre de caballo al 5% (Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra), suplementado con 5 mg/L de hemina y 1 mg/L de menadiona a 37°C, en condiciones de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂) utilizando una cámara de anaerobiosis (Bactronez-2, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, EEUU). Con el propósito de comparar la mayor virulencia del serotipo K1, se utilizó la cepa de referencia HG184 (serotipo K2), y para comparar la menor virulencia de las cepas bacterianas mutantes, se utilizó la cepa no capsular (K⁻) ATCC[®] 33277[™] de *P. gingivalis*.

Las curvas de crecimiento bacteriano se obtuvieron en caldo infusión cerebro-corazón (BD, Le Pont de Claix, Francia) suplementado con 5 mg/L de hemina y 1 mg/L de menadiona. Para ello, cada una de las cepas de *P. gingivalis* fueron inoculadas en 10 mL de caldo de cultivo hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, EEUU). Se realizaron lecturas de espectrofotómetro adicionales en distintos tiempos hasta que los microorganismos alcanzaron la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO, se tomó una muestra de 100 μ L que fue diluida de forma seriada (\log_{10}) en tampón fosfato salino (PBS) y 100 μ L de cada dilución se sembró en medio de cultivo agar sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona. Luego de 3-7 días se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se contrastó con las DO correspondientes. Se graficaron las curvas de DO *versus* tiempo y DO *versus* UFC para obtener un número conocido de UFC/mL en fase de crecimiento exponencial (Vernal, León, y cols., 2008) para realizar las inoculaciones en los animales de experimentación.

Animales de experimentación

La periodontitis experimental se indujo en ratonas hembras BALB/c de 8 semanas de edad, mantenidas en jaulas ventiladas en un número máximo de 5 animales por jaula (todos de la misma condición experimental), en las dependencias de la Plataforma Experimental Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Los animales tuvieron acceso libre a agua estéril y alimento sólido estándar estéril y se mantuvieron bajo condiciones estándar controladas, esto es, con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, luz encendida a las 07:00 am, una temperatura de $24 \pm 0,5$ °C, una humedad relativa del aire de 40-70% y un cambio de aire de 15 volúmenes habitacionales/hora.

Infección periodontal

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intra-peritoneal con 100 µL de solución 10% ketamina/2% xilacina en suero por cada 10 gramos de peso e inmediatamente fueron infectados utilizando dos inyecciones directas en la mucosa palatina entre el primer y segundo molar maxilar, tanto en el lado derecho como en el izquierdo, con 2 µL de una suspensión de 1×10^9 CFU/mL (OD_{560} 0,8-1) en PBS de cada cepa de *P. gingivalis*, con repetición a las 48 y 72 hrs (Monasterio y cols., 2018). Los controles negativos incluyeron animales no infectados y animales sham inoculados con el vehículo PBS.

Muestras biológicas

Los animales fueron eutanasiados a los 30 días post-infección bajo anestesia con ketamina/xilacina y mediante dislocación cervical. Se obtuvo la mucosa palatina total de la lesión periodontal para realizar la cuantificación de citoquinas y RANKL mediante qPCR. A su vez, se obtuvo la totalidad de linfonodos cervicales para la detección de los linfocitos Th1 y Th17 mediante citometría de flujo. El hueso maxilar se obtuvo para la cuantificación de los niveles de resorción ósea alveolar mediante micro-tomografía computarizada (µCT) y microscopía electrónica de

barrido (SEM). Finalmente, se obtuvieron muestras de maxilar completo (mucosa palatina más hueso maxilar) para la detección de osteoclastos TRAP⁺ mediante histoquímica.

Cuantificación de la resorción ósea alveolar mediante μ CT y SEM

Los huesos maxilares fueron desprovistos mecánica y químicamente de restos de tejido blando y luego se dividieron en dos mitades desde la línea media entre los incisivos centrales. Una hemi-maxila se utilizó para análisis en equipo de μ CT (SkyScan 1278; Bruker, Kontich, Bélgica), mientras que la otra hemi-maxila se utilizó para análisis mediante SEM (Jeol JSMIT300LV, Jeol Ltd, Tokio, Japón), utilizando el protocolo previamente descrito (Monasterio y cols., 2018).

Para el análisis mediante μ CT, cada hemi-maxila se posicionó en un soporte cilíndrico para ser escaneada en los tres planos espaciales. Posteriormente, se realizó una reconstrucción digital en 3D de las muestras utilizando el algoritmo de Feldkamp (Feldkamp y cols., 1984) y un software de reconstrucción (Nrecon software, Bruker, Kontich, Bélgica). Las imágenes obtenidas en 3D se reorientaron alineando el límite amelo-cementario (LAC) del primer molar (M1) y el tercer molar (M3) con el eje horizontal y, utilizando un software de visualización (Dataviewer software, Bruker, Kontich, Bélgica), se determinó un volumen 3D de interés (VOI) estándar para realizar la medición volumétrica. Como parámetros de referencia se utilizaron la raíz más mesial de M1 (M/M1), la raíz más distal de M3 (D/M3), el LAC y el ápice radicular (AR). Finalmente, mediante el uso de un software de análisis (CTan software, Bruker, Kontich, Bélgica), se calculó la pérdida ósea alveolar como el porcentaje del volumen de hueso remanente, considerando el VOI como el 100%.

Para el análisis mediante SEM, las hemi-maxilas se expusieron a peróxido de hidrógeno al 3%, se lavaron con agua mili-Q y se fijaron durante la noche a temperatura ambiente en una solución de glutaraldeído al 2,5% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza). Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS, se deshidrataron en

series ascendentes de etanol (50%, 70%, 95% y 100%) y se recubrieron con una capa de oro hasta un espesor de 200 nm. Finalmente, se cuantificó la pérdida ósea mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido, a un voltaje de aceleración de 20 kV. El análisis de la resorción ósea se realizó a una magnificación de x30 y se cuantificó el área de pérdida ósea entre la superficie mesial del primer molar maxilar y la superficie distal del tercer molar maxilar, y entre el LAC y la cresta ósea alveolar (COA) (Papathanasiou y cols., 2016). Todos los datos fueron recolectados por un solo observador (FC) que era ciego a las condiciones de las muestras de hueso maxilar.

Detección de osteoclastos TRAP⁺

Para identificar osteoclastos maduros, se analizó la expresión del marcador TRAP específico de osteoclastos mediante histoquímica. Brevemente, las muestras de maxilar total se fijaron en formalina al 10% a pH 7,4 por 24 horas a 4°C, y luego se desmineralizaron en EDTA al 14% (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) por 4 semanas. Posteriormente, se deshidrataron en series ascendentes de etanol (50%, 70%, 95% y 100%) y finalmente fueron incluidas en parafina. Para la identificación de osteoclastos TRAP⁺, se tiñeron secciones de cortes histológicos de 5 µm utilizando un kit de tinción de TRAP (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada condición, se analizaron tres secciones de maxilar en un microscopio óptico (AxioStarPlus, Carl Zeiss Co., Alemania) por un único examinador calibrado (FC). Como control positivo, se detectaron osteoclastos TRAP⁺ en una muestra de granuloma periférico de células gigantes.

Cuantificación de citoquinas y RANKL mediante qPCR

Para asociar las potenciales diferencias en la resorción ósea alveolar con la respuesta inmune local, se analizaron los niveles de expresión de los mRNA de RANKL, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-17A e IL-23 mediante qPCR. Para ello, se obtuvieron los tejidos periodontales palatinos comprendidos entre la superficie

mesial del primer molar y la superficie distal del tercer molar. Cada una de las muestras de tejido fueron divididas en fragmentos de aproximadamente 1 mm³, para luego ser homogeneizadas manualmente en un vial libre de RNAsas utilizando 1 mL de TRIzol (Invitrogen Corp., Barcelona, España). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 4°C, enseguida se les agregó 200 µL de cloroformo y se incubaron nuevamente durante 10 minutos a 4°C bajo agitación vigorosa e uniforme. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 20 minutos a 12.000 g y la fase acuosa se transfirió a un nuevo vial libre de RNAsas. El RNA citoplasmático total se precipitó durante 30 minutos en una solución de 500 µL de alcohol isopropilo y 20 µg/µL de glicógeno (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). A continuación, las muestras se centrifugaron nuevamente a 4°C durante 20 minutos a 12.000 g y el RNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, el RNA purificado se resuspendió en 10 µL de agua mili-Q libre de RNAsas y se cuantificó en un espectrofotómetro (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EEUU).

La primera hebra de cDNA se sintetizó a partir de 1µg del RNA total utilizando un kit de transcripción reversa (SuperScript III; Invitrogen, Isla Grande, NY, EEUU), según las indicaciones del fabricante. Luego, se amplificaron 10 ng de cDNA en un equipo de qPCR en tiempo real (StepOnePlus; Applied Biosystems, Singapur), utilizando partidores específicos (**Tabla 2**) y un kit de qPCR (KAPA SYBR Fast qPCR; KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU). Las reacciones de amplificación se realizaron de la siguiente manera: un primer ciclo de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 3 segundos a 95°C y de 30 segundos a 60°C. Para la detección de la formación de productos no específicos y amplificación de falsos positivos, se realizó una curva final de denaturación durante 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C. Como control endógeno de amplificación, se cuantificaron los niveles de expresión de la subunidad de rRNA 18S. Para cada condición, los experimentos se realizaron de manera separada y en triplicado.

Tabla 2. Secuencia de partidores.

Partidor	Forward	Reverse
IL-1 β	agttgacggaccccaaaag	tttgaagctggatgctctcat
IL-6	tgatggatgctaccaaactgg	ttcatgtactccaggtagctatgg
IL-12	ccaggtgtcttagccagtcc	gcagtgccaggaataatgtttca
IL-17A	cagggagagcttcatctgtgt	gctgagctttgagggatgat
IL-23	tgttgccctgggtcactc	gagcccagtcaggactgcta
IFN- γ	ggaggaactggcaaaaggat	ttcaagacttcaaagagtctgagg
RANKL	tgaagacacactacctgactcctg	cccacaatgtgttcagttc
18S rRNA	gcaattattcccatgaacg	gggacttaatcaacgcaagc

Detección de Linfocitos Th1 y Th17 mediante citometría de flujo

Para confirmar las potenciales variaciones en la respuesta inmune tipo Th1 y Th17 detectadas a nivel de citoquinas, se analizó la detección de linfocitos Th1 y Th17 en los linfonodos regionales que drenan los tejidos periodontales mediante citometría de flujo. Para ello, se analizó la doble expresión intracelular de factor de transcripción y citoquina representativas para los linajes de linfocitos Th1 (*T-bet*/IFN- γ) y Th17 (*ROR γ t*/IL-17), siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Dutzan y cols., 2016). Brevemente, a partir de los linfonodos cervicales, se obtuvo una suspensión celular total mediante fraccionamiento mecánico y posterior separación celular utilizando filtros de 70 μ m, en presencia de PBS suplementado con suero fetal bovino al 5%. Posteriormente, las células fueron cuantificadas utilizando un contador automatizado (Luna-II™ Automated Cell Counter, Logos Biosystems, Anyang, Corea). Para la identificación de la viabilidad celular, se utilizó un kit apropiado (Zombie UV™ Fixable Viability Kit, BioLegend, San Diego, CA, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego, se realizó el

marcaje de superficie celular con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD45 conjugado con BV 421, anti-CD3 conjugado con BV711 y anti-CD4 conjugado con APC-Cy7, y se incubaron a 4°C por 30 minutos. Para el marcaje intracelular, las células fueron fijadas por 30 minutos a 4°C con un tampón de fijación de citometría de flujo (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) y se permeabilizaron utilizando un tampón de permeabilización celular (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU). Finalmente, se realizó la tinción intracelular utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales intracelulares: anti-*T-bet* conjugado con PerCP-Cy5.5, anti-IFN- γ conjugado con APC, anti-*ROR γ t* conjugado con FITC y anti-IL-17A conjugado con PE. El análisis celular se realizó en un equipo de citometría de flujo (Fortessa X20, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, E.E.U.U), utilizando ventanas de adquisición sucesivas según las características FS/SS (del inglés, forward and side-scatter), viabilidad celular y los marcadores extracelulares CD45 (leucocitos), CD3 (linfocitos) y CD4 (linfocitos T colaboradores). Para determinar las poblaciones celulares negativas, se utilizaron anticuerpos control de isotipos. Para cada animal, los experimentos fueron realizados por separado.

Análisis de datos

Los datos de resorción ósea alveolar se expresan como porcentaje (μ CT) y en μm^2 (SEM) y se presentan como media \pm SD (Monasterio y cols., 2018). El porcentaje de resorción ósea alveolar se calculó usando la fórmula: $\%RO=1-(\text{volumen de fracción ósea/región de interés})\times 100$. Los datos de expresión de citoquinas y RANKL se analizaron utilizando un software de qPCR (StepOne 2.2.2 software, Applied Biosystems Singapur), normalizando la expresión de los mRNA detectados a los niveles de expresión de rRNA 18S usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando un software específico de citometría (WinMDi 2.9 software, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EEUU) y se presentan como porcentaje de la media \pm SD y número de células doble positivas. Los datos fueron analizados estadísticamente (SPSS 22.0 software, IBM Corp., Armonk, Nueva York), la normalidad de la distribución de los

datos se determinó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov y para determinar las diferencias entre los grupos se utilizó el test ANOVA y post-hoc de Bonferroni. Mediante el test χ^2 se determinaron las diferencias en los niveles de doble expresión de citoquinas y factores de transcripción analizados mediante citometría de flujo. Los coeficientes de correlación fueron obtenidos utilizando el test de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

Resorción ósea periodontal

Los niveles de resorción ósea alveolar periodontal en las hemi-maxilas de los animales infectados con las distintas cepas de *P. gingivalis* fueron cuantificados mediante μ CT y SEM. En el análisis por μ CT se detectó un menor porcentaje de resorción ósea alveolar en las lesiones periodontales inducidas con las cepas mutantes GPA o GPC en comparación a las inducidas con la cepa silvestre W50 (K1) de *P. gingivalis* (Figura 1A y 2). Se obtuvo un resultado similar en el análisis mediante SEM, ya que el área de pérdida ósea entre la superficie mesial de M/M1 y la superficie distal de D/M3, y entre el LAC y la COA, fueron menores en las lesiones periodontales inducidas por las cepas mutantes GPA o GPC en comparación a las causadas por la cepa W50 (K1) de *P. gingivalis* (Figura 1B). Estos menores niveles de resorción ósea alveolar inducidos por las cepas mutantes GPA o GPC fueron similares a los observados en las lesiones periodontales provocadas por la cepa no capsular (K⁻) de *P. gingivalis*, tanto en el análisis mediante μ CT como SEM. Por otra parte, en las lesiones periodontales inducidas por las cepas W50 (K1) y HG184 (K2) de *P. gingivalis*, se detectaron niveles similares de resorción ósea alveolar periodontal, además, ambos niveles de resorción ósea alveolar fueron mayores a los inducidos por las otras cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

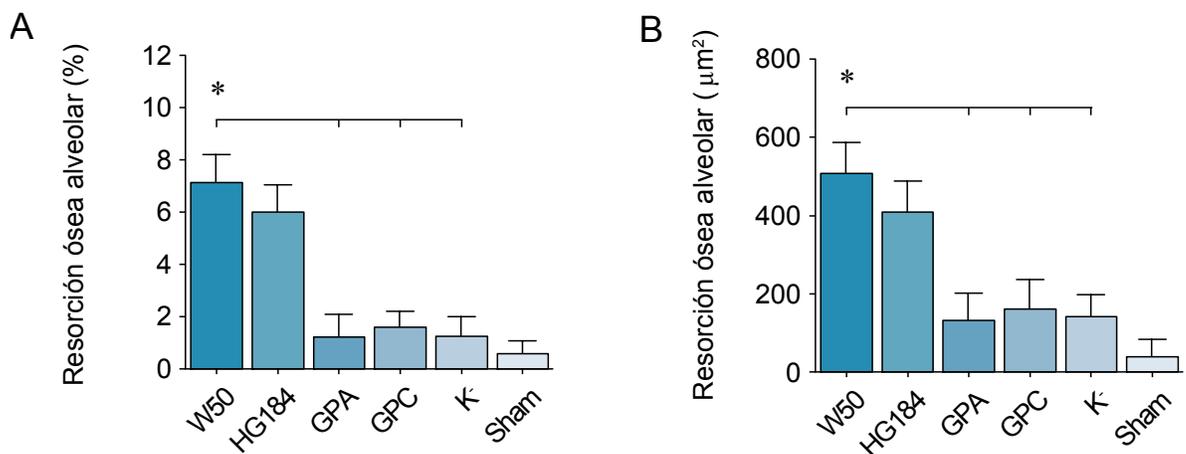


Figura 1. Niveles de resorción ósea alveolar periodontal. **A)** Porcentaje de resorción ósea alveolar periodontal cuantificado mediante μCT en hemi-maxilares de animales infectados mediante inoculación oral con 1×10^9 UFC/mL de las distintas cepas de *P. gingivalis*. Los datos se expresan en porcentaje y se muestran como media \pm SD a partir de 10 experimentos independientes. **B)** Área de resorción ósea alveolar periodontal cuantificada mediante SEM en hemi-maxilares de animales infectados mediante inoculación oral con 1×10^9 UFC/mL de las distintas cepas de *P. gingivalis*. Los datos se expresan en μm^2 y se muestran como media \pm SD a partir de 7 experimentos independientes. * $p < 0,001$. W50: serotipo K1 silvestre; HG184: serotipo K2 silvestre; GPA: cepa mutante $\Delta\text{PG0109-PG0118}$; GPC: cepa mutante $\Delta\text{PG0109-PG0118}$; K: cepa silvestre ATCC 33277 sin cápsula; Sham: condición con el vehículo PBS.

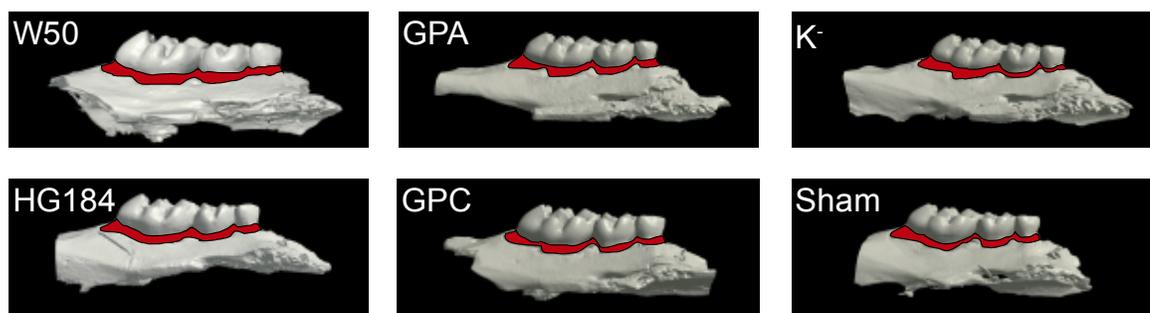


Figura 2. Imágenes 3D de la resorción ósea alveolar periodontal. Imágenes 3D representativas del análisis mediante μCT de hemi-maxilares de animales infectados mediante inoculación oral con las distintas cepas de *P. gingivalis*. W50: serotipo K1 silvestre; HG184: serotipo K2 silvestre; GPA: cepa mutante $\Delta\text{PG0109-PG0118}$; GPC: cepa mutante $\Delta\text{PG0109-PG0118}$; K: cepa silvestre ATCC 33277 sin cápsula; Sham: condición con el vehículo PBS.

Detección de osteoclastos TRAP⁺ en las lesiones periodontales experimentales

Mediante histoquímica, en las lesiones periodontales experimentales inducidas con las distintas cepas de *P. gingivalis* se realizó la detección de células que expresan el marcador TRAP específico de osteoclastos en todas las condiciones experimentales (Figura 3). Se observó una menor cantidad de osteoclastos TRAP⁺ en los animales infectados con las cepas mutantes GPA o GPC en comparación a los infectados con la cepa silvestre W50 (K1) de *P. gingivalis*. En cambio, la detección de osteoclastos TRAP⁺ en los animales infectados con la cepa no capsular (K⁻) de *P. gingivalis* fue similar a la observada en los animales infectados con las cepas mutantes GPA o GPC. Por último, la detección de osteoclastos TRAP⁺ fue similar entre los animales infectados con la cepa W50 (K1) y HG184 (K2) de *P. gingivalis*. Por último, se detectó una escasa presencia de osteoclastos TRAP⁺ en los animales inoculados con el vehículo PBS.

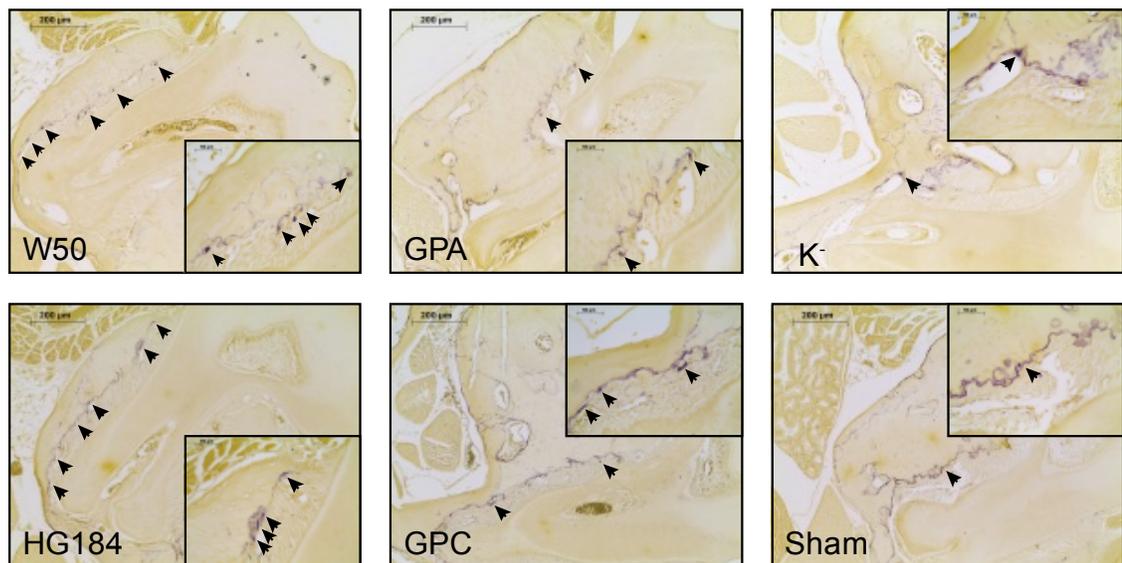


Figura 3. Detección de osteoclastos TRAP⁺. Detección mediante histoquímica de células que expresan el marcador TRAP específico de osteoclastos (flechas) en lesiones periodontales de animales infectados mediante inoculación oral con 1×10^9 UFC /mL de las distintas cepas de *P. gingivalis*. W50: serotipo K1 silvestre; HG184: serotipo K2 silvestre; GPA: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; GPC: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; K⁻: cepa silvestre ATCC 33277 sin cápsula; Sham: condición con el vehículo PBS.

Expresión de citoquinas en las lesiones periodontales experimentales

En las lesiones periodontales experimentales inducidas mediante inoculación oral con las cepas W50 (K1), GPA (Δ PG0116-PG0120), GPC (Δ PG0109-PG0118), HG184 (K2) y ATCC 33277 (K⁻) de *P. gingivalis*, se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas de los perfiles linfocitarios Th1 (IFN- γ , IL-1 β e IL-12) y Th17 (IL-6, IL-17A e IL-23) mediante qPCR (Figura 4). Se detectaron menores niveles de expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17A e IL-23 en las infecciones periodontales inducidas con las cepas mutantes GPA y GPC de *P. gingivalis*, en comparación a las inducidas con la cepa silvestre W50 (K1). Además, estos menores niveles de expresión de las citoquinas provocados por las cepas mutantes GPA y GPC fueron similares a los inducidos por la cepa no capsular (K⁻) de *P. gingivalis*. Por otro lado, en ratones infectados con las cepas W50 (K1) y HG184 (K2) se observaron mayores niveles de expresión de las citoquinas analizadas.

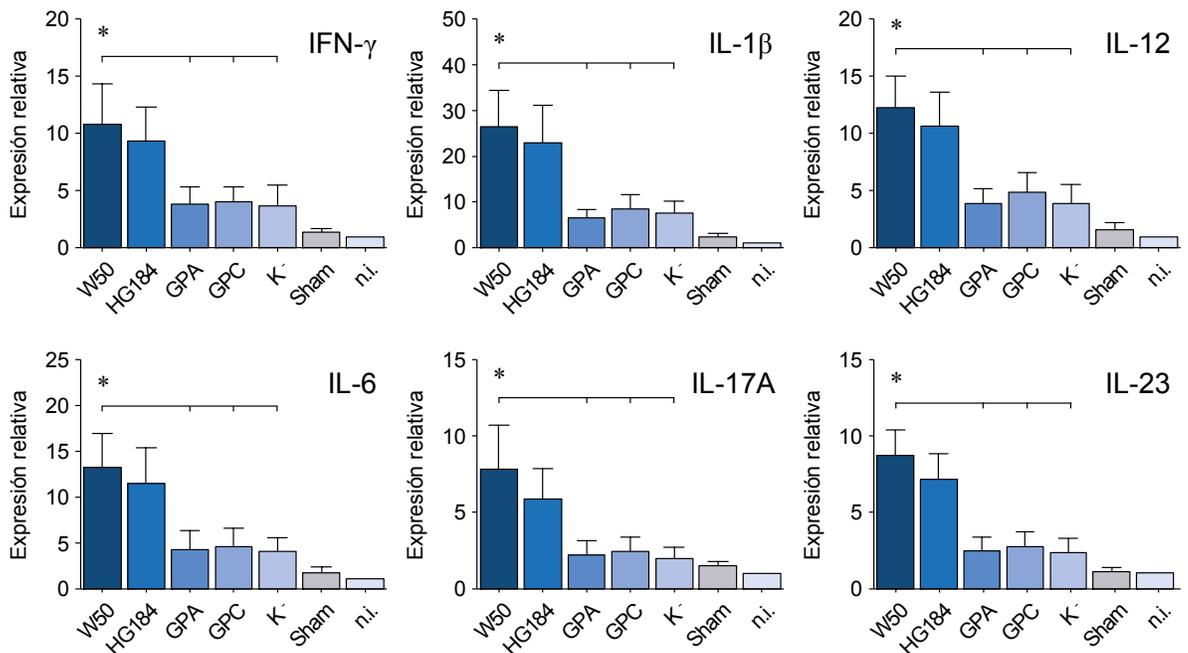


Figura 4. Niveles de expresión de citoquinas de los perfiles linfocitarios Th1 y Th17 en las lesiones periodontales experimentales. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A e IL-23 en lesiones periodontales inducidas en animales de experimentación mediante inoculación oral con 1×10^9 UFC/mL de las distintas cepas de *P. gingivalis*. Como referencia para los niveles de expresión relativa, se consideró

como valor 1 a la expresión de mRNA para cada citoquina en animales no inducidos (n.i). Los datos se expresan como niveles de expresión relativa de mRNA y se muestran como media \pm SD a partir de 10 experimentos independientes. Cada experimento se realizó en duplicado. * $p < 0,001$. W50: serotipo K1 silvestre; HG184: serotipo K2 silvestre; GPA: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; GPC: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; K⁻: cepa silvestre ATCC 33277 sin cápsula; Sham: condición con el vehículo PBS; n.i: no inducido.

Expresión de RANKL en las lesiones periodontales experimentales

En las lesiones periodontales experimentales inducidas mediante inoculación oral con las cepas W50 (K1), GPA (Δ PG0116-PG0120), GPC (Δ PG0109-PG0118), HG184 (K2) y ATCC 33277 (K⁻) de *P. gingivalis* se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA del factor pro-resorción ósea RANKL mediante qPCR (Figura 5). En las infecciones periodontales inducidas por las cepas mutantes GPA y GPC de *P. gingivalis*, se detectaron menores niveles de expresión de RANKL en comparación a las infecciones periodontales inducidas con la cepa W50 (K1) de *P. gingivalis*, mientras que en las lesiones periodontales causadas por la cepa no capsular (K⁻) de *P. gingivalis* se observaron niveles similares de expresión de RANKL en comparación a los inducidos por las cepas mutantes GPA y GPC. Por otro lado, se obtuvo una expresión similar de RANKL entre las lesiones periodontales provocadas por las cepas W50 (K1) y HG184 (K2).

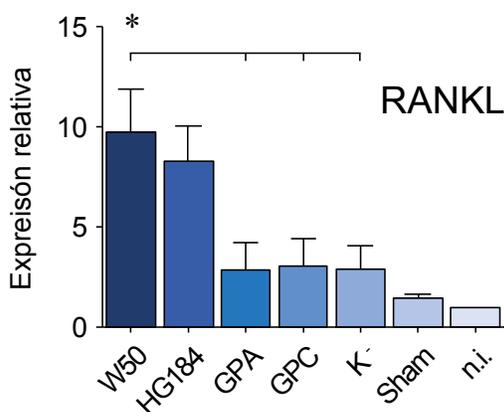


Figura 5. Niveles de expresión de RANKL en las lesiones periodontales experimentales. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de mRNA de RANKL en lesiones periodontales inducidas en animales de experimentación mediante inoculación oral con 1×10^9 UFC/mL de las distintas cepas de *P. gingivalis*. Como referencia para los niveles de expresión relativa, se consideró

como valor 1 a la expresión de mRNA de RANKL en animales no inducidos. Los datos se expresan como niveles de expresión relativa de mRNA y se muestran como media \pm SD a partir de 10 experimentos independientes. Cada experimento se realizó en duplicado. * $p < 0,001$. W50: serotipo K1 silvestre; HG184: serotipo K2 silvestre; GPA: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; GPC: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; K: cepa silvestre ATCC 33277 sin cápsula; Sham: condición con el vehículo PBS; n.i: no inducido.

Correlación entre los niveles de expresión de citoquinas y RANKL

A partir de los datos obtenidos mediante qPCR, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los niveles de expresión de mRNA de RANKL y los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas del perfil linfocitario Th17 (IL-6, IL-17A e IL-23) (Figura 6), con el objetivo de establecer si los cambios descritos en la expresión de RANKL se asocian a la producción de citoquinas de cada fenotipo linfocitario. En las lesiones periodontales experimentales inducidas con las cepas del serotipo K1 de *P. gingivalis* y sus mutantes isogénicas GPA y GPC, se detectó una correlación positiva y significativa entre los niveles de expresión de RANKL y las citoquinas analizadas del perfil linfocitario Th17. Estos resultados sugieren que los cambios en los niveles de expresión de RANKL se asocian con la función de los linfocitos Th17.

Detección de linfocitos Th1 y Th17 en linfonodos cervicales

La asociación entre los fenotipos linfocitarios Th1 y Th17 y la secreción de sus citoquinas características fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 7). A partir de los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales inducidas con las distintas cepas de *P. gingivalis*, en células vivas CD45⁺CD3⁺CD4⁺, se realizó la detección de las subpoblaciones linfocitarias efectoras Th1 y Th17 analizando los niveles de expresión intracelular de T-bet/IFN- γ (factor de transcripción y citoquina característica del fenotipo linfocitario Th1) y ROR γ t/IL-17 (factor de transcripción y citoquina característica del fenotipo linfocitario Th17).

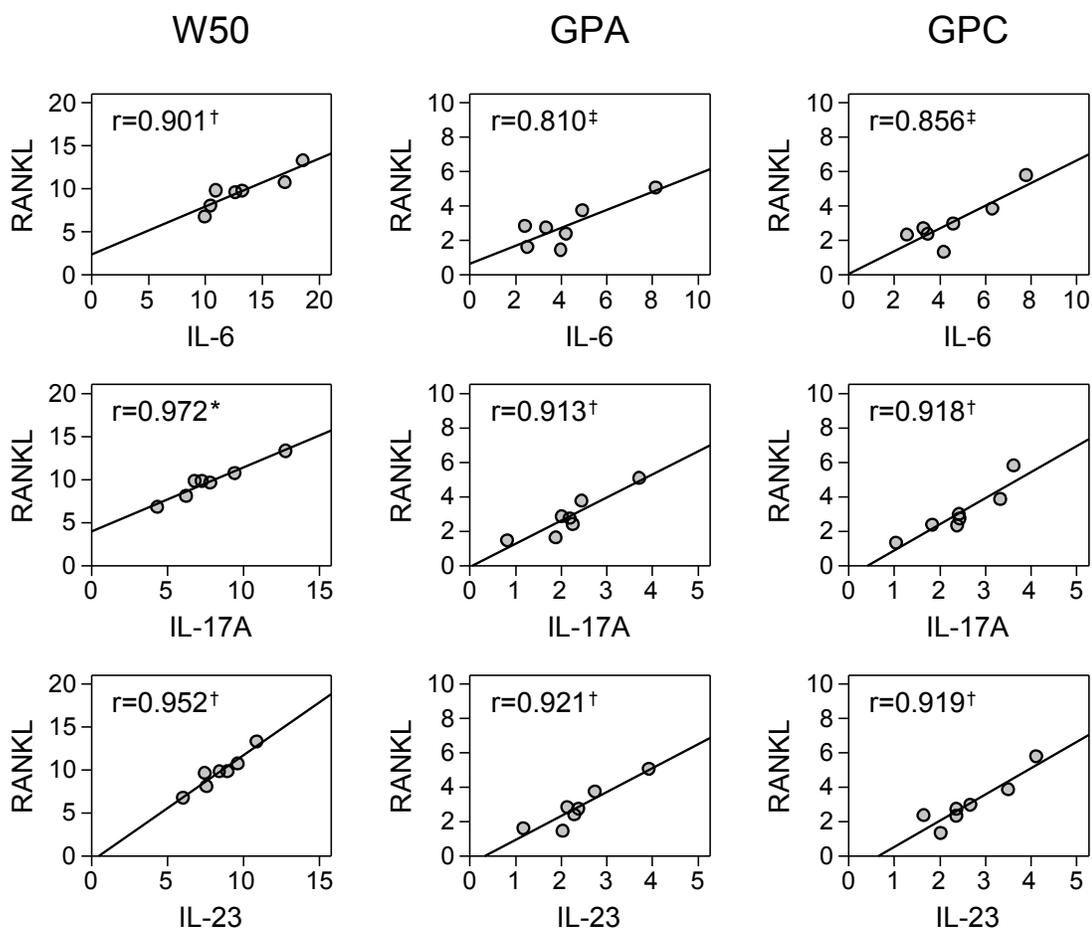


Figura 6. Correlación entre los niveles de expresión de citoquinas y RANKL. Análisis de la correlación entre los niveles expresión del mRNA de las citoquinas IL-6, IL-17A e IL-23 y los niveles de expresión de mRNA de RANKL en las lesiones periodontales inducidas en animales de experimentación mediante inoculación oral con las cepas W50 (K1), GPA (Δ PG0116-PG0120) y GPC (Δ PG0109-PG0118) de *P. gingivalis*. Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 7 experimentos independientes. * $p < 0,001$, † $p < 0,01$ y ‡ $p < 0,05$.

Cuando las infecciones periodontales fueron inducidas con las cepas mutantes GPA o GPC, en los linfonodos cervicales se detectó un menor número de linfocitos Th1 CD45⁺CD3⁺CD4⁺/Tbet⁺IFN- γ ⁺ y Th17 CD45⁺CD3⁺CD4⁺/ROR γ t⁺IL-17⁺ en comparación a las infecciones periodontales inducidas con la cepa W50 (K1) de *P. gingivalis*. Además, en las infecciones periodontales inducidas por la cepa no capsular (K⁻) de *P. gingivalis* los niveles de linfocitos Th1 y Th17 fueron similares a los detectados en las lesiones periodontales inducidas con las cepas mutantes

GPA o GPC. Por otro lado, en las lesiones periodontales inducidas por las cepas W50 (K1) y HG184 (K2) de *P. gingivalis* se observaron niveles similares de linfocitos Th1 y Th17.

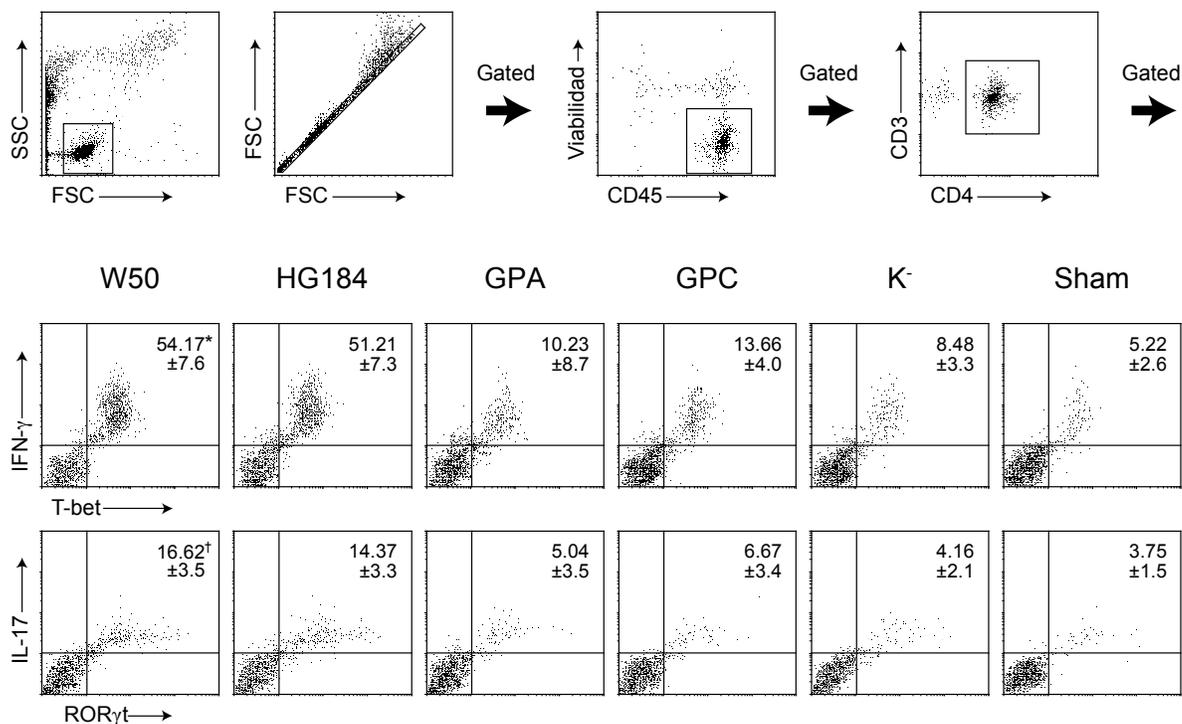


Figura 7. Detección de linfocitos Th1 y Th17 en linfonodos cervicales. Análisis mediante citometría de flujo del doble marcaje intracelular de T-bet/IFN- γ y ROR γ t/IL-17 que evidencia la presencia de linfocitos Th1 secretores de IFN- γ y de linfocitos Th17 secretores de IL-17 en los linfonodos cervicales que drenan las lesiones periodontales inducidas en animales de experimentación mediante inoculación oral con 1×10^9 UFC de las distintas cepas de *P. gingivalis*. A partir de 10 experimentos independientes, los datos de citometría de flujo se representaron como porcentaje promedio \pm SD de células vivas doble positivas sobre el total de células CD45⁺CD3⁺CD4⁺ analizadas en cada condición experimental. Cada experimento fue realizado en duplicado. * $p < 0,001$ y [†] $p < 0,01$. W50: serotipo K1 silvestre; HG184: serotipo K2 silvestre; GPA: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; GPC: cepa mutante Δ PG0109-PG0118; K-: cepa silvestre ATCC 33277 sin cápsula; Sham: condición con el vehículo PBS.

8. DISCUSIÓN

La cápsula extracelular de *P. gingivalis* constituye un factor de virulencia fundamental en la invasión de los tejidos del hospedero y evasión de su respuesta inmune (Holt y cols., 1999; Aduse-Opoku y cols., 2006). Además, durante la periodontitis actúa como inmunógeno activando la respuesta inmuno-inflamatoria y osteodestructiva a nivel periodontal (Moutsopoulos y cols., 2012; Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014; Vernal, Diaz-Zuniga, y cols., 2014). En este estudio se analizó el rol de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* en un modelo experimental de periodontitis y sus efectos en la respuesta inmune local tipo Th1 y Th17, en los niveles de actividad osteoclástica y en la resorción ósea alveolar periodontal. Los resultados indican que en las lesiones periodontales experimentales las cepas mutantes isogénicas construidas a partir de la cepa W50 de *P. gingivalis*, caracterizadas por carecer de cápsula extracelular, inducen menores niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias de los perfiles linfocitarios Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteodestructivo), en comparación a la cepa silvestre. Además, inducen menos niveles de RANKL, detección de osteoclastos TRAP⁺ y resorción ósea alveolar periodontal. Finalmente, en los linfonodos cervicales que drenan los tejidos periodontales infectados, inducen menor presencia de linfocitos Th1 y Th17.

Las diferencias observadas en relación a la capacidad inmuno-estimuladora entre los distintos serotipos capsulares y entre las cepas capsulares y no capsulares de *P. gingivalis* analizadas en este estudio podrían deberse, al menos en parte, a las diferencias en la composición de los polisacáridos capsulares. La publicación de la secuencia genómica completa de la cepa W83 (serotipo K1) de *P. gingivalis* permitió revelar cuatro posibles loci para la biosíntesis de la cápsula extracelular (Nelson y cols., 2003). Estudios posteriores permitieron determinar, mediante análisis y comparación del genoma completo de las cepas W83 y ATCC 33277 (serotipo K⁻), que la cepa ATCC 33277 carece del locus PG0106-PG0120, el cual se ha vinculado con la síntesis de los polisacáridos capsulares de la cepa W83 (T. Chen y cols., 2004). La evidencia experimental que permitió establecer el

locus de la biosíntesis de los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis* surgió del estudio de Aduse-Opoku y cols. en el cual, mediante mutagénesis por delección, se crearon mutantes isogénicas del serotipo K1 que carecían de varios genes del locus PG0106-PG0120. Estas mutantes no poseen cápsula extracelular ni evidencian reactividad al suero anti-K1 (Aduse-Opoku y cols., 2006), motivo por el cual fueron utilizadas en el presente estudio. Además, mediante análisis de los polimorfismos del locus PG0106-PG0120, se demostró que existe una variación significativa de este locus entre los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*; sin embargo, entre las distintas cepas bacterianas pertenecientes al serotipo K1, tal como W50, el locus PG0106-PG0120 es altamente conservado (Aduse-Opoku y cols., 2006; Brunner y cols., 2008; Brunner, Wittink, y cols., 2010). Estas variaciones genéticas en el locus de la biosíntesis de la cápsula extracelular entre los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* podrían explicar la variación en la composición de los polisacáridos capsulares que la constituyen, como también, las diferencias en el potencial inmunogénico entre los distintos serotipos.

En los tejidos periodontales, el eje RANKL/RANK/OPG está involucrado directamente en la regulación de la remodelación del hueso alveolar en condiciones fisiológicas y patológicas (Hasegawa y cols., 2002), como por ejemplo, en la odontogénesis (Ohazama y cols., 2004), en la resorción ósea alveolar durante la erupción de la dentición definitiva (Wise y cols., 2002), en la reabsorción radicular fisiológica de la dentición decidua (Lossdorfer y cols., 2002), en la destrucción del hueso alveolar en granulomas periapicales (Vernal, Dezerega, y cols., 2006) y durante la periodontitis (Teng y cols., 2000; Taubman y Kawai, 2001; Crotti y cols., 2003; Liu y cols., 2003; Mogi y cols., 2004; Vernal y cols., 2004). En la periodontitis, se ha establecido que existe un incremento en los niveles de RANKL en los tejidos periodontales (Liu y cols., 2003; Vernal y cols., 2004; Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Han y cols., 2013), el que a su vez induce una mayor actividad de los osteoclastos locales al favorecer su diferenciación y activación a partir los precursores celulares de la línea de los monocitos (Baron, 1989; Teitelbaum, 2007; Hienz y cols., 2015). Este incremento en la osteoclastogénesis mediada por RANKL lleva a un aumento en la resorción ósea

alveolar, causando finalmente la pérdida inserción periodontal que se revela clínicamente (McCauley y Nohutcu, 2002; Nagasawa y cols., 2007; Hienz y cols., 2015).

Diversos estudios señalan a los linfocitos Th1 y Th17 como los principales responsables del aumento en los niveles de RANKL en los tejidos periodontales afectados de periodontitis (Taubman y cols., 2001; Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Han y cols., 2007; Vernal y García-Sanz, 2008; Cheng y cols., 2014). Los linfocitos Th17 secretan directamente RANKL (Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Vernal y García-Sanz, 2008; Cheng y cols., 2014). Además, mediante la secreción de IL-17A, los linfocitos Th17 inducen la activación de otras células secretoras de RANKL, como por ejemplo, osteoblastos, fibroblastos y macrófagos (Yasuda y cols., 1998; Sato y cols., 2006; Vernal, Dutzan, y cols., 2006; Vernal y García-Sanz, 2008; Cheng y cols., 2014). Por su parte, los linfocitos Th1 estimulan indirectamente la actividad de los osteoclastos al inducir la expresión de RANKL en osteoblastos y en linfocitos Th17, mediante la secreción de sus citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-12 y TNF- α (Boyle y cols., 2003; Dong, 2006; Weaver y cols., 2006; Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014). En el presente estudio, las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular, en comparación a las cepas K1 y K2, inducen una menor respuesta Th1 y Th17 en los tejidos periodontales infectados. Además, la menor detección de osteoclastos TRAP⁺ en las lesiones periodontales inducidas por estas mutantes podría asociarse a los menores niveles de RANKL detectados en dichas lesiones, como consecuencia directa e indirecta de la disminución en la función Th1 y Th17. Según lo expuesto anteriormente y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, la presencia de una cepa capsular de *P. gingivalis* en la placa bacteriana subgingival, en especial del serotipo K1, podría asociarse al desarrollo de lesiones periodontales más severas debido al aumento en la respuesta linfocitaria Th1 y Th17 en los tejidos periodontales afectados, lo que a su vez determina la mayor producción local de RANKL y la subsecuente resorción ósea alveolar periodontal.

Diversos estudios han evidenciado la patogenicidad de la cápsula extracelular de *P. gingivalis*. Estos estudios han involucrado la utilización de serotipos capsulares genéticamente distintos y su inoculación en ambientes extraorales (Grenier y Mayrand, 1987; Neiders y cols., 1989; Laine y cols., 1998). Sumado a lo anterior, los resultados de diversas investigaciones permiten especular que el mayor potencial patogénico de este factor de virulencia podría deberse a su capacidad de modular la respuesta inmune en el hospedero (Grenier y Mayrand, 1987; Neiders y cols., 1989; Laine y cols., 1998; Vernal y cols., 2009; Kunnen y cols., 2012; Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014). Al respecto, en células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos capsulares y con cepas no capsulares de *P. gingivalis*, se detectó una mayor expresión de citoquinas del perfil linfocitario Th1 en presencia del serotipo K1 y K2 (Vernal y cols., 2009). Del mismo modo, en monocitos que fueron estimulados con la cepa capsular K1 de *P. gingivalis* se observó un aumento en los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12, en comparación a monocitos inducidos con la cepa no capsular K $\bar{}$ de *P. gingivalis*, además se estableció que el aumento en los niveles de dichas citoquinas no se correlacionó al efecto del lipopolisacárido bacteriano (Kunnen y cols., 2012). Asimismo, linfocitos T estimulados con células dendríticas autólogas expuestas a los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* expresaron mayores niveles de citoquinas y factores de transcripción de los perfiles linfocitarios Th1 y Th17, en comparación a las mismas células estimuladas con cepas no capsulares (Vernal, Díaz-Guerra, y cols., 2014). Por otro lado, estudios recientes han asociado la presencia de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* con una mayor resorción ósea alveolar durante la periodontitis, ya que en un modelo murino de esta patología se demostró que en infecciones periodontales mixtas de *Fusobacterium nucleatum* con una cepa capsular de *P. gingivalis* (serotipo K5) aumentó el nivel de resorción ósea alveolar en comparación a infecciones periodontales mixtas de *F. nucleatum* con una cepa no capsular (K $\bar{}$) (Polak y cols., 2017). Mientras que en lesiones periodontales experimentales inducidas en animales infectados con la cepa capsular A7A1-28 (serotipo K3) de *P. gingivalis*, se indujo una mayor resorción ósea alveolar, a diferencia de las infecciones inducidas con cepas carentes de cápsula extracelular

(W381 y ATCC 33277) (Wilensky y cols., 2009). Es importante destacar que todos estos estudios involucraron la comparación entre cepas bacterianas de *P. gingivalis* genéticamente diferentes. En consecuencia, los efectos que se atribuyen a los serotipos capsulares podrían ser en realidad debido a estas variaciones genéticas y no necesariamente producto de la presencia o ausencia de cápsula extracelular. Por lo anterior, nuestro estudio involucró la utilización de una cepa bacteriana capsular silvestre y dos mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular.

La presente investigación, es la primera en analizar el rol de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* en la respuesta linfocitaria Th1 y Th17 y en la resorción ósea alveolar *in vivo*, utilizando 2 cepas mutantes isogénicas del serotipo K1 de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular en un modelo murino de periodontitis. Los resultados obtenidos indican variaciones cuantitativamente significativas en el patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17 al comparar la cepa capsular silvestre W50 de *P. gingivalis* y sus mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular. En conjunto, estos datos nos permiten explicar en parte la variabilidad en la inmunogenicidad y virulencia entre las cepas capsulares y no capsulares de *P. gingivalis*, como también ratificar el mayor potencial patogénico de las cepas capsulares analizadas. En este sentido, nuestros resultados contribuyen a explicar, desde un punto de vista osteo-inmunológico, el rol de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* en el inicio y progresión de la periodontitis.

Según el reciente modelo de etiopatogenia de la periodontitis postulado por Hajishengallis y cols., el inicio de la enfermedad se debe a la disbiosis de las comunidades microbianas que componen la biopelícula subgingival. Esta disbiosis sería inducida por la presencia de patógenos claves como *P. gingivalis* (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012). El concepto de patógeno clave hace referencia a aquellos microorganismos patógenos que se encuentran en baja abundancia en una comunidad microbiana; sin embargo, tienen la capacidad modular enfermedades inflamatorias mediante la transformación de la microbiota benigna simbiótica en una microbiota disbiótica asociada a enfermedad (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012; Hajishengallis y Lamont, 2012). En este

sentido, *P. gingivalis* es considerado un patógeno clave en la periodontitis, ya que en la biopelícula subgingival de sitios asociados a periodontitis su abundancia es baja (Moore y cols., 1982) y a pesar de ello, es capaz de alterar la respuesta inmune del hospedero y causar cambios en la composición de la microbiota periodontal simbiótica. Esto provoca un estado de disbiosis microbiana que induce una respuesta inmuno-inflamatoria y osteodestructiva en los tejidos periodontales (Hajishengallis y cols., 2011). Los efectos de *P. gingivalis* como patógeno clave podrían ejercerse tanto por la modulación de la respuesta inmune del hospedero como por el efecto de sinergia bacteriana que provoca en las comunidades microbianas la biopelícula subgingival (Hajishengallis y Lamont, 2012). En ambos casos, estos efectos dependen de la presencia en la bacteria de sus factores de virulencia (Hajishengallis y cols., 2011; Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012). A pesar de lo anteriormente señalado, diversos estudios han establecido que *P. gingivalis* puede aislarse desde la biopelícula de sitios asociados a salud periodontal (Haffajee y cols., 1998; Ximenez-Fyvie y cols., 2000; Mayanagi y cols., 2004; Diaz y cols., 2006). Estos antecedentes permiten plantear la pregunta de por qué su presencia no siempre se asocia al desarrollo de la patología. La explicación a esta interrogante podría implicar variaciones en el estado del sistema inmunológico del hospedero y/o variaciones en la proporción relativa de sus distintas formas serotípicas presentes y que afecten su rol como patógeno clave integral durante la periodontitis (Hajishengallis, Darveau, y cols., 2012). Considerando esto, una arista interesante por explorar es el rol de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* en el contexto de una comunidad microbiana periodontal simbiótica. Esto permitiría evaluar si la ausencia de este factor de virulencia atenúa el efecto disruptor de *P. gingivalis* en el equilibrio de las comunidades microbianas de la biopelícula periodontal. Del mismo modo, se podría analizar si las mutantes isogénicas del serotipo K1 de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular compiten por el nicho ecológico con los serotipos capsulares silvestres. A partir de estos resultados, se podrían proyectar nuevas estrategias terapéuticas centradas en la creación de probióticos con las mutantes isogénicas carentes de cápsula extracelular. De esta manera, se podría reemplazar en el nicho ecológico específico y así modular la respuesta inmuno-

inflamatoria y osteodestructiva característica de la periodontitis (Alanzi y cols., 2018; Bustamante y cols., 2019).

Finalmente, considerando la relevancia clínica de la presencia del serotipo K1 en la biopelícula subgingival, los resultados del presente estudio permiten proyectar nuevos enfoques en el diagnóstico microbiológico periodontal orientados a la creación de herramientas diagnósticas que permitan identificar particularmente la presencia de los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* en la placa bacteriana subgingival (Brunner y cols., 2008).

9. CONCLUSIONES

1. En las lesiones periodontales experimentales, las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular inducen menores niveles de expresión de citoquinas asociadas a un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en comparación a la cepa bacteriana silvestre.

2. En las lesiones periodontales experimentales, las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular inducen menores niveles de expresión RANKL, en comparación a la cepa bacteriana silvestre.

3. Los niveles de expresión de las citoquinas de los perfiles linfocitarios Th1 y Th17 en las lesiones periodontales inducidas por las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular o la cepa bacteriana silvestre se correlacionan positivamente con los niveles de expresión de RANKL.

4. En las lesiones periodontales experimentales se detectó una menor cantidad de osteoclastos TRAP⁺ cuando las infecciones periodontales fueron inducidas con las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular, en comparación a la cepa bacteriana silvestre.

5. En las lesiones periodontales experimentales se detectó una menor resorción ósea alveolar periodontal cuando las infecciones periodontales fueron inducidas con las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular, en comparación a la cepa bacteriana silvestre.

6. En linfonodos cervicales que drenan las infecciones periodontales se detectó una menor cantidad de linfocitos Th1 y Th17 cuando las infecciones periodontales fueron inducidas con las cepas mutantes isogénicas de *P. gingivalis* carentes de cápsula extracelular, en comparación a la cepa bacteriana silvestre.

7. La cápsula extracelular de *P. gingivalis* tiene un rol en la resorción ósea alveolar durante la periodontitis, y ésta pérdida ósea se asocia a un patrón de respuesta linfocitaria tipo Th1 y Th17.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., y Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787-793. doi: 10.1038/383787a0
- Aduse-Opoku, J., Slaney, J. M., Hashim, A., Gallagher, A., Gallagher, R. P., Rangarajan, M., y cols. (2006). Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 74(1), 449-460. doi: 10.1128/iai.74.1.449-460.2006
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M., y Akdis, C. A. (2012). TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol*, 129(6), 1438-1449; quiz1450-1431. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.003
- Alanzi, A., Honkala, S., Honkala, E., Varghese, A., Tolvanen, M., y Soderling, E. (2018). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Benef Microbes*, 9(4), 593-602. doi: 10.3920/BM2017.0139
- Aranha, A. M., Repeke, C. E., Garlet, T. P., Vieira, A. E., Campanelli, A. P., Trombone, A. P., y cols. (2013). Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endodont*, 39(1), 83-87. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.015
- Asikainen, S., y Chen, C. (1999). Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, 20, 65-81.
- Azuma, M. (2006). Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res*, 41(5), 361-373. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00896.x
- Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T., Dufour, L., Johnson, E., y Roopenian, D. C. (1999). CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*, 67(6), 2804-2809.
- Baron, R. (1989). Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec*, 224(2), 317-324. doi: 10.1002/ar.1092240220
- Beem, J. E., Hurley, C. G., Magnusson, I., McArthur, W. P., y Clark, W. B. (1991). Subgingival microbiota in squirrel monkeys with naturally occurring periodontal diseases. *Infect Immun*, 59(11), 4034-4041.
- Belibasakis, G. N., y Bostanci, N. (2012). The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*, 39(3), 239-248. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x
- Belibasakis, G. N., Meier, A., Guggenheim, B., y Bostanci, N. (2011). Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells. *Microb Pathog*, 50(1), 6-11. doi: 10.1016/j.micpath.2010.11.002
- Bluestone, J. A., y Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3(3), 253-257. doi: 10.1038/nri1032

- Boyle, W. J., Simonet, W. S., y Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342. doi: 10.1038/nature01658
- Brunner, J., Crielaard, W., y van Winkelhoff, A. J. (2008). Analysis of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Porphyromonas gingivalis* and development of a K1-specific polymerase chain reaction-based serotyping assay. *J Periodontal Res*, 43(6), 698-705. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01075.x
- Brunner, J., Scheres, N., El Idrissi, N. B., Deng, D. M., Laine, M. L., van Winkelhoff, A. J., y cols. (2010). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol*, 10, 5. doi: 10.1186/1471-2180-10-5
- Brunner, J., Wittink, F. R., Jonker, M. J., de Jong, M., Breit, T. M., Laine, M. L., y cols. (2010). The core genome of the anaerobic oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*, 10, 252. doi: 10.1186/1471-2180-10-252
- Bustamante, M., Oomah, B. D., Mosi-Roa, Y., Rubilar, M., y Burgos-Diaz, C. (2019). Probiotics as an Adjunct Therapy for the Treatment of Halitosis, Dental Caries and Periodontitis. *Probiotics Antimicrob Proteins*. doi: 10.1007/s12602-019-9521-4
- Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Crippa, G. E., Rosa, A. L., Junior, W. M., Rossi, M. A., y cols. (2009). Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, 24(1), 1-6. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00463.x
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., y cols. (2003). Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*, 38(4), 380-387.
- Cutler, C. W., y Jotwani, R. (2004). Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000*, 35, 135-157. doi: 10.1111/j.0906-6713.2004.003560.x
- Cutler, C. W., y Teng, Y. T. (2007). Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: many sides of the same coin with new twists. *Periodontol 2000*, 45, 35-50. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00222.x
- Chen, P. B., Neiders, M. E., Millar, S. J., Reynolds, H. S., y Zambon, J. J. (1987). Effect of immunization on experimental *Bacteroides gingivalis* infection in a murine model. *Infect Immun*, 55(10), 2534-2537.
- Chen, T., Hosogi, Y., Nishikawa, K., Abbey, K., Fleischmann, R. D., Walling, J., y cols. (2004). Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 186(16), 5473-5479. doi: 10.1128/JB.186.16.5473-5479.2004
- Cheng, W. C., Hughes, F. J., y Taams, L. S. (2014). The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 41(6), 541-549. doi: 10.1111/jcpe.12238
- d'Empaire, G., Baer, M. T., y Gibson, F. C., 3rd. (2006). The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect Immun*, 74(11), 6236-6243. doi: 10.1128/IAI.00519-06

- Di Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S., y Grano, M. (2013). Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*, 2013, 503754. doi: 10.1155/2013/503754
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benitez, A., Ciuchi, P., y cols. (2015). Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *J Periodontol*, 86(1), 108-119. doi: 10.1902/jop.2014.140326
- Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., Jr., y cols. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*, 72(4), 2837-2848. doi: 10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006
- Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*, 6(4), 329-333. doi: 10.1038/nri1807
- Dutzan, N., Abusleme, L., Konkel, J. E., y Moutsopoulos, N. M. (2016). Isolation, characterization and functional examination of the gingival immune cell network. *J Vis Exp*(108), 53736. doi: 10.3791/53736
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., y cols. (2009). Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 80(2), 290-296. doi: 10.1902/jop.2009.080287
- Ebersole, J. L., Kesavalu, L., Schneider, S. L., Machen, R. L., y Holt, S. C. (1995). Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis*, 1(3), 115-128.
- Ebersole, J. L., y Taubman, M. A. (1994). The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 112-141.
- Eke, P. I., Braswell, L., Arnold, R., y Fritz, M. (1993). Sub-gingival microflora in *Macaca mulatta* species of rhesus monkey. *J Periodontal Res*, 28(1), 72-80.
- Faghri, J., Moghim, S., Abed, A. M., Rezaei, F., y Chalabi, M. (2007). Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in chronic periodontitis by multiplex PCR. *Pak J Biol Sci*, 10(22), 4123-4127.
- Farquharson, S. I., Germaine, G. R., y Gray, G. R. (2000). Isolation and characterization of the cell-surface polysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 53978. *Oral Microbiol Immun*, 15(3), 151-157.
- Feldkamp, L. A., Davis, L. C., y Kress, J. W. (1984). Practical Cone-beam algorithm. *J Opt Soc AM A*, 1(6), 612-619. doi: Doi 10.1364/Josaa.1.000612
- Friedewald, V. E., Kornman, K. S., Beck, J. D., Genco, R., Goldfine, A., Libby, P., y cols. (2009).
- The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol*, 80(7), 1021-1032. doi: 10.1902/jop.2009.097001
- Gafan, G. P., Lucas, V. S., Roberts, G. J., Petrie, A., Wilson, M., y Spratt, D. A. (2004). Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. *J Clin Microbiol*, 42(9), 4141-4146. doi: 10.1128/JCM.42.9.4141-4146.2004

- Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*, 89(12), 1349-1363. doi: 10.1177/0022034510376402
- Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M., y Silva, J. S. (2003). Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*, 38(2), 210-217.
- Gemmell, E., Yamazaki, K., y Seymour, G. J. (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000*, 43, 14-40. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00173.x
- Graves, D. T., Oates, T., y Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*, 3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304
- Grenier, D., y Mayrand, D. (1987). Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 25(4), 738-740.
- Grenier, D., y McBride, B. C. (1987). Isolation of a membrane-associated *Bacteroides gingivalis* glycyloprolyl protease. *Infect Immun*, 55(12), 3131-3136.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., Jr., y cols. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25(5), 346-353.
- Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*, 29(6), 248-257. doi: 10.1111/omi.12065
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., y Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10(10), 717-725. doi: 10.1038/nrmicro2873
- Hajishengallis, G., y Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 27(6), 409-419. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., y cols. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*, 10(5), 497-506. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.006
- Han, X., Kawai, T., y Taubman, M. A. (2007). Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 45, 76-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00215.x
- Han, X., Lin, X., Yu, X., Lin, J., Kawai, T., LaRosa, K. B., y cols. (2013). *Porphyromonas gingivalis* infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF-kappaB ligand. *Infect Immun*, 81(5), 1502-1509. doi: 10.1128/IAI.00043-13
- Harrington, L. E., Mangan, P. R., y Weaver, C. T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 18(3), 349-356. doi: 10.1016/j.coi.2006.03.017
- Hasegawa, T., Yoshimura, Y., Kikuri, T., Yawaka, Y., Takeyama, S., Matsumoto, A., y cols. (2002). Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and

- osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, 37(6), 405-411.
- Hienz, S. A., Paliwal, S., y Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*, 2015, 615486. doi: 10.1155/2015/615486
- Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S., y Genco, C. A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, 20, 168-238.
- Houri-Haddad, Y., Wilensky, A., y Shapira, L. (2007). T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000*, 45, 67-75. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00227.x
- How, K. Y., Song, K. P., y Chan, K. G. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathogenic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 7, 53. doi: 10.3389/fmicb.2016.00053
- Jabeen, R., y Kaplan, M. H. (2012). The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol*, 24(3), 303-307. doi: 10.1016/j.coi.2012.02.001
- Jiao, Y., Hasegawa, M., y Inohara, N. (2014). Emerging roles of immunostimulatory oral bacteria in periodontitis development. *Trends Microbiol*, 22(3), 157-163. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.005
- Kato-Kogoe, N., Nishioka, T., Kawabe, M., Kataoka, F., Yamanegi, K., Yamada, N., y cols. (2012). The promotional effect of IL-22 on mineralization activity of periodontal ligament cells. *Cytokine*, 59(1), 41-48. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.024
- Kesavalu, L., Ebersole, J. L., Machen, R. L., y Holt, S. C. (1992). *Porphyromonas gingivalis* virulence in mice: induction of immunity to bacterial components. *Infect Immun*, 60(4), 1455-1464.
- Kunnen, A., Dekker, D. C., van Pampus, M. G., Harmsen, H. J., Aarnoudse, J. G., Abbas, F., y cols. (2012). Cytokine production induced by non-encapsulated and encapsulated *Porphyromonas gingivalis* strains. *Arch Oral Biol*, 57(11), 1558-1566. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.013
- Laine, M. L., Appelmek, B. J., y van Winkelhoff, A. J. (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 31(4), 278-284.
- Laine, M. L., y van Winkelhoff, A. J. (1998). Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immun*, 13(5), 322-325.
- Lamont, R. J., y Jenkinson, H. F. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), 1244-1263.
- Leibbrandt, A., y Penninger, J. M. (2008). RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*, 1143, 123-150. doi: 10.1196/annals.1443.016
- Lin, J., Bi, L., Yu, X., Kawai, T., Taubman, M. A., Shen, B., y cols. (2014). *Porphyromonas gingivalis* exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infect Immun*, 82(10), 4127-4134. doi: 10.1128/IAI.02084-14

- Liu, D., Xu, J. K., Figliomeni, L., Huang, L., Pavlos, N. J., Rogers, M., y cols. (2003). Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*, 11(1), 17-21.
- Lossdorfer, S., Gotz, W., y Jager, A. (2002). Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*, 71(1), 45-52. doi: 10.1007/s00223-001-2086-7
- Mayanagi, G., Sato, T., Shimauchi, H., y Takahashi, N. (2004). Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol*, 19(6), 379-385. doi: 10.1111/j.1399-302x.2004.00172.x
- McCauley, L. K., y Nohutcu, R. M. (2002). Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*, 73(11), 1377-1391. doi: 10.1902/jop.2002.73.11.1377
- Meurman, J. H., Sanz, M., y Janket, S. J. (2004). Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol M*, 15(6), 403-413.
- Meyle, J., y Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 69(1), 7-17. doi: 10.1111/prd.12104
- Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N., y Togari, A. (2004). Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*, 83(2), 166-169. doi: 10.1177/154405910408300216
- Monasterio, G., Castillo, F., Ibarra, J. P., Guevara, J., Rojas, L., Alvarez, C., y cols. (2018). Alveolar bone resorption and Th1/Th17-associated immune response triggered during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis are serotype-dependent. *J Periodontol*. doi: 10.1002/JPER.17-0563
- Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A., y Ranney, R. R. (1982). Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun*, 38(3), 1137-1148.
- Moutsopoulos, N. M., Kling, H. M., Angelov, N., Jin, W., Palmer, R. J., Nares, S., y cols. (2012). Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun*, 39(4), 294-303. doi: 10.1016/j.jaut.2012.03.003
- Moutsopoulos, N. M., Konkkel, J., Sarmadi, M., Eskan, M. A., Wild, T., Dutzan, N., y cols. (2014). Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Sci Transl Med*, 6(229), 229ra240. doi: 10.1126/scitranslmed.3007696
- Nagasawa, T., Kiji, M., Yashiro, R., Hormdee, D., Lu, H., Kunze, M., y cols. (2007). Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 43, 65-84. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00185.x
- Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeuchi, H., Yoshioka, H., y cols. (2008). Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in

- cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol*, 23(2), 170-172. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00406.x
- Neiders, M. E., Chen, P. B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J. J., Shlossman, M., y cols. (1989). Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res*, 24(3), 192-198.
- Nelson, K. E., Fleischmann, R. D., DeBoy, R. T., Paulsen, I. T., Fouts, D. E., Eisen, J. A., y cols. (2003). Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol*, 185(18), 5591-5601.
- Offenbacher, S., Lieff, S., Boggess, K. A., Murtha, A. P., Madianos, P. N., Champagne, C. M., y cols. (2001). Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Ann Periodontol*, 6(1), 164-174. doi: 10.1902/annals.2001.6.1.164
- Ohazama, A., Courtney, J. M., y Sharpe, P. T. (2004). Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res*, 83(3), 241-244. doi: 10.1177/154405910408300311
- Oliveira, F. A., Forte, C. P., Silva, P. G., Lopes, C. B., Montenegro, R. C., Santos, A. K., y cols. (2015). Molecular Analysis of Oral Bacteria in Heart Valve of Patients With Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Medicine (Baltimore)*, 94(47), e2067. doi: 10.1097/MD.0000000000002067
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., y cols. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S162-S170. doi: 10.1111/jcpe.12946
- Papathanasiou, E., Kantarci, A., Konstantinidis, A., Gao, H., y Van Dyke, T. E. (2016). SOCS-3 Regulates Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Dent Res*, 95(9), 1018-1025. doi: 10.1177/0022034516645332
- Pataro, A. L., Cortelli, S. C., Abreu, M. H., Cortelli, J. R., Franco, G. C., Aquino, D. R., y cols. (2016). Frequency of periodontal pathogens and *Helicobacter pylori* in the mouths and stomachs of obese individuals submitted to bariatric surgery: a cross-sectional study. *J Appl Oral Sci*, 24(3), 229-238. doi: 10.1590/1678-775720150534
- Polak, D., Ferdman, O., y Houry-Haddad, Y. (2017). *Porphyromonas gingivalis* Capsule-Mediated Coaggregation as a Virulence Factor in Mixed Infection With *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol*, 88(5), 502-510. doi: 10.1902/jop.2016.160397
- Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A., y Crean, S. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis*, 36(4), 665-677. doi: 10.3233/JAD-121918
- Reiner, S. L. (2007). Development in motion: helper T cells at work. *Cell*, 129(1), 33-36. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.019
- Sakellari, D., Menti, S., y Konstantinidis, A. (2008). Free soluble receptor activator of nuclear factor-kappa ligand in gingival crevicular fluid correlates with

- distinct pathogens in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 35(11), 938-943.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., y cols. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S5-S11. doi: 10.1111/jcpe.12682
- Saremi, A., Nelson, R. G., Tulloch-Reid, M., Hanson, R. L., Sievers, M. L., Taylor, G. W., y cols. (2005). Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(1), 27-32.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., y cols. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 203(12), 2673-2682. doi: 10.1084/jem.20061775
- Schifferle, R. E., Reddy, M. S., Zambon, J. J., Genco, R. J., y Levine, M. J. (1989). Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol*, 143(9), 3035-3042.
- Singh, A., Wyant, T., Anaya-Bergman, C., Aduse-Opoku, J., Brunner, J., Laine, M. L., y cols. (2011). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun*, 79(11), 4533-4542. doi: 10.1128/IAI.05016-11
- Singh Rao, S. K., Harding, A., Poole, S., Kesavalu, L., y Crean, S. (2015). Porphyromonas gingivalis Periodontal Infection and Its Putative Links with Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm*, 2015, 137357. doi: 10.1155/2015/137357
- Slots, J., y Ting, M. (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 20, 82-121.
- Sorsa, T., Mantyla, P., Tervahartiala, T., Pussinen, P. J., Gamonal, J., y Hernandez, M. (2011). MMP activation in diagnostics of periodontitis and systemic inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(9), 817-819. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01753.x
- Stelzel, M., Conrads, G., Pankuweit, S., Maisch, B., Vogt, S., Moosdorf, R., y cols. (2002). Detection of *Porphyromonas gingivalis* DNA in aortic tissue by PCR. *J Periodontol*, 73(8), 868-870. doi: 10.1902/jop.2002.73.8.868
- Stockinger, B., y Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*, 19(3), 281-286. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.005
- Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. F., y Kitetsu, S. (2005). The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 32(4), 369-374. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00676.x
- Taubman, M. A., y Kawai, T. (2001). Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(2), 125-135.

- Teitelbaum, S. L. (2007). Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*, 170(2), 427-435. doi: 10.2353/ajpath.2007.060834
- Teng, Y. T., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y. Y., Gorczynski, R. M., Singh, B., y cols. (2000). Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest*, 106(6), R59-67.
- Tomita, S., Komiya-Ito, A., Imamura, K., Kita, D., Ota, K., Takayama, S., y cols. (2013). Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb Pathogenesis*, 61-62, 11-15. doi: 10.1016/j.micpath.2013.04.006
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., y Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, 10(8), 864-871. doi: 10.1038/ni.1770
- Van Steenberghe, T. J., Delemarre, F. G., Namavar, F., y De Graaff, J. (1987). Differences in virulence within the species *Bacteroides gingivalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 53(4), 233-244.
- van Winkelhoff, A. J., Appelmelk, B. J., Kippuw, N., y de Graaff, J. (1993). K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiol Immunol*, 8(5), 259-265.
- Vanterpool, S. F., Been, J. V., Houben, M. L., Nikkels, P. G., De Krijger, R. R., Zimmermann, L. J., y cols. (2016). *Porphyromonas gingivalis* within Placental Villous Mesenchyme and Umbilical Cord Stroma Is Associated with Adverse Pregnancy Outcome. *PLoS One*, 11(1), e0146157. doi: 10.1371/journal.pone.0146157
- Vernal, R., Chaparro, A., Graumann, R., Puente, J., Valenzuela, M. A., y Gamonal, J. (2004). Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*, 75(12), 1586-1591. doi: 10.1902/jop.2004.75.12.1586
- Vernal, R., Dezerega, A., Dutzan, N., Chaparro, A., Leon, R., Chandia, S., y cols. (2006). RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis*, 12(3), 283-289. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01191.x
- Vernal, R., Díaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M., y García-Sanz, J. A. (2014). Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol*, 41(1), 19-30. doi: 10.1111/jcpe.12176
- Vernal, R., Diaz-Zuniga, J., Melgar-Rodriguez, S., Pujol, M., Diaz-Guerra, E., Silva, A., y cols. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *J Clin Periodontol*, 41(5), 451-459. doi: 10.1111/jcpe.12236
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Antonieta Valenzuela, M., y Gamonal, J. (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(4), 383-389. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00684.x

- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandia, S., Puente, J., León, R., y cols. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol*, 77(10), 1772-1780. doi: 10.1902/jop.2006.050376
- Vernal, R., y García-Sanz, J. A. (2008). Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infect Disord Drug Targets*, 8(4), 207-220.
- Vernal, R., León, R., Herrera, D., García-Sanz, J. A., Silva, y Sanz, M. (2008). Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, 43(6), 689-697.
- Vernal, R., Leon, R., Silva, A., van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A., y Sanz, M. (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol*, 36(10), 823-829. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01462.x
- Wara-aswapati, N., Surarit, R., Chayasodom, A., Boch, J. A., y Pitiphat, W. (2007). RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 78(6), 1062-1069. doi: 10.1902/jop.2007.060398
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., y Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24(6), 677-688. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.002
- Whitfield, C., y Roberts, I. S. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 31(5), 1307-1319.
- Wilensky, A., Polak, D., Awawdi, S., Halabi, A., Shapira, L., y Houry-Haddad, Y. (2009). Strain-dependent activation of the mouse immune response is correlated with *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 36(11), 915-921. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01464.x
- Wise, G. E., Frazier-Bowers, S., y D'Souza, R. N. (2002). Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(4), 323-334.
- Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., y Socransky, S. S. (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27(9), 648-657.
- Xu, X., Tong, T., Yang, X., Pan, Y., Lin, L., y Li, C. (2017). Differences in survival, virulence and biofilm formation between sialidase-deficient and W83 wild-type *Porphyromonas gingivalis* strains under stressful environmental conditions. *BMC Microbiol*, 17(1), 178. doi: 10.1186/s12866-017-1087-2
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., y cols. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3597-3602.
- Zenobia, C., y Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*, 69(1), 142-159. doi: 10.1111/prd.12083

11. ANEXOS



**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
FACULTAD DE ODONTOLÓGICA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

CERTIFICADO

El Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, declara que el proyecto FONDECYT Regular 1181780, titulado "Role of IL-35, all-trans retinoic acid, and T regulatory-derived exosomes in inhibiting the tooth supporting bone resorption during periodontitis through modulation of the Th17/Treg imbalance", cuyo investigador principal es el Dr. Rolando Vernal, se encuentra aprobado por este Comité con fecha 7 de junio 2018.



**Dr. Eduardo Fernández Godoy
Presidente CEC**

Santiago, Junio 2018.



Santiago, 06 de junio de 2018.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto Fondecyt regular N°1181780 titulado “**Role of IL-35, all-trans retinoic acid, and T regulatory-derived exosomes in inhibiting the tooth-supporting bone resorption during periodontitis through modulation of the Th17/Treg imbalance**”. El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Rolando Vernal Astudillo, Académico del Departamento de Odontología Conservadora, Facultad Odontología, Universidad de Chile.

Los ensayos propuestos involucran la inyección de las bacterias *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ambas de Grupo de Riesgo 2) en los tejidos gingivales palatinos de ratones machos Rag1^{-/-}, y la realización de ensayos de detección de la infección y producción de citoquinas a través de qPCR, análisis histológico, test de Elisa y citometría de flujo. Además, se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo irritantes, inflamables y tóxicos.

Los ensayos se realizarán en la Plataforma Experimental, Laboratorio de Microbiología y en el Laboratorio de Biología Periodontal, todos ellos pertenecientes a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Vernal para ser presentado al Concurso Fondecyt Regular 2018.



Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 29781792-29781816, Fax: 29781748, Santiago.

<http://odontologia.uchile.cl>

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 29781793 Fax: 29781748, Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>

