

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“Polarización de macrófagos en formas clínicamente sintomáticas de periodontitis apical: rol del lipopolisacárido de especies de *Porphyromonas* sobre la expresión de receptores tipo Toll y su regulación epigenética”**

**PABLO VELOSO MATTA  
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**Directora de Tesis: Prof. Dra. Marcela Hernández  
Co-Directores de Tesis: Prof. Dra. Anilei Hoare  
Prof. Dr. Alejandro Escobar**

**Santiago - Chile  
2021**



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“Polarización de macrófagos en formas clínicamente sintomáticas de periodontitis apical: rol del lipopolisacárido de especies de *Porphyromonas* sobre la expresión de receptores tipo Toll y su regulación epigenética”**

**PABLO VELOSO MATTA  
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**Directora de Tesis: Prof. Dra. Marcela Hernández  
Co-Directores de Tesis: Prof. Dra. Anilei Hoare  
Prof. Dr. Alejandro Escobar**

**Santiago - Chile  
2021**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS

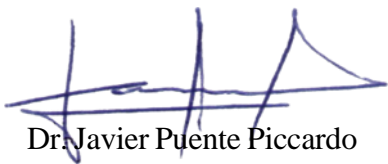
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

**Pablo Gianfranco Veloso Matta**

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el 13 de julio de 2021.

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**




Dr. Javier Puente Piccardo



Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez



Dr. Sergio Álvarez Armijo



Dra. Denisse Bravo Rodríguez  
(Presidenta comisión Revisora)

## **DEDICATORIA**

**Dedicado a todos mis profesores y maestros, desde los profesores en colegios católicos de la Región de Aysén, pasando por las escuelas y colegios, tanto católicos como laicos, de la Región del Maule, hasta todas mis profesoras y mentores de la Universidad de Chile. Sin ellos, mi amor por las ciencias y el inescrutable rompecabezas del universo no sería el mismo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi directora de tesis, Dra. Marcela Hernández, gracias a su trabajo he podido presentar los resultados de la presente tesis por el continente, pulir mis habilidades y convertirme en mejor investigador.**

**A la Dra. Anilei Hoare y a el Dr. Alejandro Escobar por su apoyo y consejos durante el transcurso de este trabajo.**

**A Jessica Astorga, Alejandra Fernández y Claudia Terraza, su apoyo técnico fue inconmensurable. También a Bárbara Pesce por su apoyo en el trabajo de citometría de flujo y a Darna Venegas, Daniela Salinas y Carla Benavente por su apoyo en el laboratorio de microbiología.**

**A todos los integrantes del Laboratorio de Biología Periodontal y del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por solo nombrar algunos; Dr. Rolando Vernal, Leticia Rojas, Carla Alvarez, Emilio Cafferata, Angelica Cardenas, Daniela Poblete, Gustavo Monasterio, Francisca, Michelle, Bernardita Parada, Maria Jose Salas, Alfredo Castro, Carolina Rojas, Jaime Díaz, Samanta Melgar.**

**A los equipos de trabajo de la Dra. Andrea Paula-Lima y la Dra. Cecilia Hidalgo, sin ellos no habría entrado al programa de doctorado y este trabajo no existiría.**

**A la Comisión Revisora, que gracias a sus observaciones, aportes y exigencias me permitieron mejorar este trabajo de tesis y a mí como profesional.**

**A Daniel Veloso y Claudia Matta por todo el apoyo económico, moral y espiritual que me han entregado todos estos años, siguen siendo unos excelentes padres.**

**A mi familia y amigos que me permitieron mantener un cable a tierra durante estos últimos años de doctorado como también durante la contingencia. Se nota cuando hacen falta.**

## **PRODUCTOS**

### 1. Publicaciones (Internacionales / Nacionales)

#### 1.1 Autoría

Autores: P. Veloso, A. Fernández, C. Terraza, C. Álvarez, R. Vernal, A. Escobar, M. Hernández.

Título: Macrophages skew towards M1 profile through reduced CD163 expression in symptomatic apical periodontitis.

Revista: Clinical Oral Investigation. 2020. 24. 1-11

Estado: Publicado

Indexación: ISI.

#### 1.2 Co-autoría

Autores: A. Hernández-Caldera, R. Vernal, R. Paredes, P. Veloso-Matta, J. Astorga & M. Hernández

Título: Human periodontal ligament fibroblasts synthesize C-reactive protein and Th-related cytokines in response to interleukin (IL)-6 trans-signalling.

Revista: Int. Endod. J. 2017. 51. 632-640.

Estado: Publicado

Indexación: ISI

Autores: A. Fernández, A. M. Cárdenas, J. Astorga, P. Veloso, A. Alvarado, P. Merino, D. Pino, D. Reyes-Court & M. Hernández.

Título: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis.

Revista: Clinical Oral Investigations. 2018. 23. 1-8.

Estado: Publicado

Indexación: ISI.

Autores: A. Fernández, P. Veloso, J. Astorga, C. Rodríguez, V. Torres, P. Gebicke-Haerter, M. Valdés, M. Garrido, M. Hernández.

Título: Epigenetic regulation of TLR2-mediated periapical inflammation and angiogenesis.

Revista: International Endodontic Journal.

Estado: Publicado. 2020. 53. 1229-1237

Indexación: ISI.

## 2. Participación en Proyectos de investigación con registro formal

Título del Proyecto: Endodontic pathogen-induced macrophage responsiveness profiles and their epigenetic regulation as determinants for systemic inflammation and treatment response in chronic apical periodontitis.

Código: FONDECYT 1160741

Fuente de financiamiento: FONDECYT Regular

Año de inicio y término: 2016-2019

Investigador responsable: Marcela Hernández

Calidad de Participación: Tesista de Doctorado.

## 3. Presentaciones a Congresos (Nacionales / Internacionales con resúmenes)

Autores: **P. Veloso**, H. Marcela.

Título: THP-1 differentiation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and *Escherichia coli* lipopolysaccharides as a first step to characterize macrophage plasticity exposed to *Porphyromonas Endodontalis* lipopolysaccharides

Nombre congreso: I Reunión Anual de la Asociación Chilena de inmunología.

Ciudad: Curauma, Valparaíso, Chile.

Fecha: 28 abril 2017

Publicación en revista: Si

Autores: **P. Veloso**, A. Fernández, J. Astorga, C. Alvarez, R. Vernal, A. Escobar, A. Hoare, M. Hernández.

Título: Asymptomatic apical periodontitis macrophages exhibit an M1 profile

Nombre congreso: VII congreso de la Región Latinoamericana IADR y XIII Reunión Anual de la Sociedad Uruguaya de Investigación Odontología

Ciudad: Montevideo, Uruguay.

Fecha: 30 agosto – 1 septiembre 2018

Publicación en revista: Si

Autores: **P. Veloso**, A. Fernández, J. Astorga, C. Alvarez, R. Vernal, A. Escobar, A. Hoare, M. Hernández.

Título: Macrophages increase their polarization towards M1 and M2 in symptomatic apical periodontitis.

Nombre congreso: XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, XL Congreso Chile de Microbiología, II Reunión Anual de la Asociación Chilena de inmunología y IX Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis.

Ciudad: Santiago, Chile.

Fecha: 13-16 noviembre 2018

Publicación en revista: ALAM 2018 XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Libro de Resúmenes. Pag 1065.

Autores: **P. Veloso**, A. Fernández, C. Terraza, C. Álvarez, R. Vernal, A. Escobar, M. Hernández.

Título: Pro-inflammatory Cytokine Expression and Macrophages Polarization in SAP over AAP.

Nombre congreso: 97th General session and exhibition of the International Association for Dental Research.

Ciudad: Vancouver, Canadá

Fecha: 19-22 junio 2019

Publicación en revista: IADR General Session Program Book. Pag 181.



Autores: **P. Veloso**, J. Astorga, A. Castro, M. Hernández, A. Hoare.  
Título: Nucleic acid-free extraction protocol development for characterization of *Porphyromonas* Lipopolysaccharide.  
Nombre Congreso: XXXI Reunión Anual de la International Association for Dental Research (IADR) Chile.  
Ciudad: Santiago, Chile.  
Fecha: 29-30 agosto 2019  
Publicación en revista: XXXI Reunión Anual IADR División Chilena Abstract Book. Pag 26.

Autores: P. Veloso, J. Astorga, A. Escobar, A. Hoare, M. Hernández.  
Título: *Porphyromonas gingivalis*, Not *P. endodontalis*, Lipopolysaccharide induces Macrophage M1 Profile  
Nombre Congreso: XXXII Reunión Anual IADR División Chilena. Santiago, Chile.  
Ciudad: Santiago, Chile.  
Fecha: 30-31 Julio 2020

#### 4. Premios

Autores: **P. Veloso**, J. Astorga, A. Escobar, A. Hoare, M. Hernández.  
Título: *Porphyromonas gingivalis*, Not *P. endodontalis*, Lipopolysaccharide induces Macrophage M1 Profile  
Nombre Congreso: XXXII Reunión Anual IADR División Chilena. Santiago, Chile.  
Fecha: 30-31 Julio 2020  
Premio: “Dr. Eduardo Couve” al Mejor Trabajo de Biología Oral.

## ABREVIACIONES

|                     |   |
|---------------------|---|
| ALEO.....           | Lesión apical de Origen Endodóntico                               |
| ATCC.....           | Colección Americana de Cultivos Tipo                              |
| CD14.....           | Cluster de Diferenciación 14                                      |
| CD163.....          | Cluster de Diferenciación 163                                     |
| CD206.....          | Cluster de Diferenciación 206                                     |
| CD64.....           | Cluster de Diferenciación 64                                      |
| CD80.....           | Cluster de Diferenciación 80                                      |
| ADNc.....           | ADN complementario  |
| CpG.....            | sitios de citosina fosfatoguanina                                 |
| HPL.....            | Ligamento Periodontal Sano  |
| IFM.....            | Intensidad de fluorescencia Media                                 |
| IL-10.....          | interleuquina 10  |
| IL-12.....          | interleuquina 12  |
| IL-1 $\beta$ .....  | Interleuquina 1 beta  |
| IL-6.....           | interleuquina 6   |
| KDO.....            | Ácido 3-desoxi-D-manno-oct-2-ulosónico                            |
| LPS.....            | Lipopolisacárido  |
| MOI.....            | Multiplicidad de Infección  |
| ARNm.....           | ARN mensajero   |
| OAg.....            | Antígeno O  |
| PAA.....            | Periodontitis apical asintomática                                 |
| PAC.....            | Periodontitis apical crónica                                      |
| PAS.....            | Periodontitis apical sintomática                                  |
| PMA.....            | Forbol 12-miristato 13-acetato                                    |
| qPCR.....           | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa |
| ARN.....            | Ácido ribonucleico  |
| ARNr.....           | ARN ribosomal   |
| RT-PCR.....         | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa     |
| TGF- $\beta$ .....  | Factor de crecimiento transformante beta                          |
| THP-1.....          | Línea celular de monocitos humanos derivados de leucemia          |
| TLR.....            | Receptor tipo <i>toll</i>   |
| TNF- $\alpha$ ..... | Factor de Necrosis Tumoral alfa                                   |

# INDICE

|  |            |
|--|------------|
| <b>I. RESUMEN.....</b>   | <b>xiv</b> |
| <b>II. ABSTRACT .....</b>  | <b>xv</b>  |
| <b>III. ANTECEDENTES .....</b>   | <b>1</b>   |
| III.1 Periodontitis apical crónica.....  | 1          |
| III.2 Papel del lipopolisacárido de <i>P. endodontalis</i> y <i>P. gingivalis</i> .....  | 1          |
| III.3 Receptores tipo Toll median la respuesta inflamatoria de macrófagos .....  | 3          |
| III.4 Plasticidad de macrófagos.....   | 4          |
| IV Objetivos Específicos .....   | 7          |
| <b>IV. Hipótesis.....</b>  | <b>7</b>   |
| V. Objetivos Generales .....   | 7          |
| <b>VII. METODOLOGIA.....</b>   | <b>8</b>   |
| VII.1 Muestras de LA .....   | 8          |
| VII.2 Caracterización M1/M2 mediante citometría de flujo .....   | 8          |
| VII.3 Niveles transcripcionales de citoquinas.....   | 9          |
| VII.4 Purificación de LPS.....   | 9          |
| VII.5 Diferenciación y estimulación de macrófagos a partir de células THP-1 .....  | 10         |
| VII.6 Determinación de niveles de TLR2 y TLR4.....   | 11         |
| <b>VIII. RESULTADOS.....</b>   | <b>12</b>  |
| VIII.1 Caracterización de los perfiles de diferenciación de macrófagos M1 y M2 y expresión génica de citoquinas asociadas en lesiones apicales provenientes de pacientes con periodontitis apical sintomática, asintomática y ligamentos sanos.....                      | 12         |
| VIII.1.1 Perfil fenotípico de macrófagos es predominante M1 en periodontitis apical sintomática .....  | 12         |
| VIII.1.2 Perfil de expresión de citoquinas en macrófagos es predominante M1 en periodontitis apical sintomática .....  | 18         |
| VIII.2 Perfiles de diferenciación M1/M2 y citoquinas asociadas en macrófagos estimulados <i>in vitro</i> con LPS de <i>P. endodontalis</i> , <i>P. gingivalis</i> y la combinación de ambos .....  | 20         |
| VIII.2.1 Extracción y purificación del lipopolisacárido de <i>P. gingivalis</i> y <i>P. endodontalis</i> .....   | 20         |
| VIII.2.2 Diferenciación de línea celular monocítica humana THP-1 a macrófagos.....   | 22         |
| VIII.2.3 El LPS de <i>P. gingivalis</i> , no así el LPS de <i>P. endodontalis</i> , induce una respuesta inflamatoria predominantemente M1 en macrófagos <i>in vitro</i> .....   | 27         |
| VIII.2.3.1 Estimulación de macrófagos <i>in vitro</i> con LPS de <i>P. gingivalis</i> o <i>P. endodontalis</i> .....   | 27         |
| VIII.2.3.2 EL LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> no inducen un perfil fenotípico M1 sobre la base de la doble expresión de marcadores de superficie en macrófagos <i>in vitro</i> .....  | 27         |
| VIII.2.3.3 El LPS de <i>P. gingivalis</i> , no así el LPS de <i>P. endodontalis</i> , disminuye la población de macrófagos CD64 <sup>+</sup> y aumenta la CD80 <sup>+</sup> .....  | 29         |
| VIII.2.3.4 El LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> no inducen un perfil fenotípico M2 en macrófagos <i>in vitro</i> .....  | 31         |
| VIII.2.3.5 El LPS de <i>P. gingivalis</i> induce la secreción de citoquinas M1 en macrófagos <i>in vitro</i> .....   | 34         |
| VIII.3 Determinar <i>in vitro</i> cambios en la regulación génica y expresión proteica en superficie celular de TLR2 y TLR4 en macrófagos diferenciados de THP-1 estimulados con el LPS de <i>P. endodontalis</i> , <i>P. gingivalis</i> y la combinación de ambos. .... | 36         |

|   |    |
|---|----|
| VIII.3.1. El LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o de <i>P. endodontalis</i> no inducen cambios en los niveles transcripcionales de TLR2 y TLR4 en macrófagos <i>in vitro</i> ..... | 36 |
| VIII.3.2. El LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o de <i>P. endodontalis</i> no inducen cambio en los niveles de superficie de TLR2 y TLR4 en macrófagos <i>in vitro</i> .....      | 36 |
| <b>IX. DISCUSIÓN</b> .....  | 40 |
| <b>X. CONCLUSION</b> .....  | 51 |
| <b>XI. OBSERVACIONES DE EVALUADORES Y SU INCORPORACIÓN</b> .....  | 52 |
| <b>XII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 53 |
| <b>XIII. ANEXO</b> .....  | 59 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Identificación de monocitos/macrófagos en lesiones apicales endodónticas y controles sanos.....   | 13 |
| Figura 2. Porcentajes de las poblaciones de macrófagos M1 y M2 en las lesiones apicales endodónticas y controles sanos .....  | 14 |
| Figura 3. Expresión de marcadores M1 y M2 de lesiones apicales endodónticas.....  | 15 |
| Figura 4. Expresión génica de citoquinas en lesiones apicales endodónticas y controles sanos.....   | 17 |
| Figura 5. Perfiles de lipopolisacáridos de <i>P. gingivalis</i> y <i>P. endodontalis</i> visualizados en geles de Tris-Tricina teñidos con plata.....   | 19 |
| Figura 6. Evaluación de la pureza y actividad endotóxica de LPS .....   | 21 |
| Figura 7. Morfología de las células THP-1 diferenciadas con PMA .....   | 23 |
| Figura 8. Expresión génica de IL-1 $\beta$ en células THP-1 diferenciadas a macrófagos con PMA .....  | 24 |
| Figura 9. Porcentaje de células doble positivas para marcadores M1 y marcadores M2 y razón M1/M2 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> .....     | 26 |
| Figura 10. Porcentaje de células positivas para marcadores M1 y expresión de marcadores M1 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con el LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> .....        | 28 |
| Figura 11. Porcentaje de células positivas para marcadores M2 expresión de marcadores M2 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> .....             | 30 |
| Figura 12. Concentración de citoquinas M1 de macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con LPS <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> .....   | 32 |
| Figura 13. Concentración de citoquinas M2 de macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con LPS <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> .....   | 33 |
| Figura 14. Expresión génica de TLR2 y TLR4 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con el LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> .....  | 35 |
| Figura 15. Porcentaje de células TLR2 <sup>+</sup> y TLR4 <sup>+</sup> y expresión de TLR2 y TLR4 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con el LPS de <i>P. gingivalis</i> y/o <i>P. endodontalis</i> ..... | 37 |

## I. RESUMEN

**Hipótesis:** La forma clínicamente sintomática de periodontitis apical se asocia con una respuesta pro-inflamatoria con predominio del perfil M1 de macrófagos. Este perfil de respuesta y la expresión del receptor TLR2 y TLR4 está determinado en parte, por el lipopolisacárido de *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis*.

**Resultados:** Caracterizamos el perfil de polarización M1 o M2 de macrófagos en lesiones apicales de origen endodóntico (ALEO) de pacientes con periodontitis apical sintomática (PAS), asintomática (PAA) y ligamento periodontal sano (HPL) mediante citometría de flujo. Nuestros resultados indican que macrófagos fenotípicamente exhiben una menor polarización a M2 en PAS sobre PAA y HPL. Funcionalmente, PAS presentó mayores niveles de ARNm de citoquinas M1 y reducción de ARNm de TGF- $\beta$  en PAS sobre PAA y HPL. Lo anterior apunta a un mayor balance de macrófagos M1 sobre M2 en PAS comparado con PAA.

También, determinamos los perfiles pro- y anti-inflamatorios y la expresión de TLR2 y TLR4 en macrófagos humanos *in vitro* estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*. El LPS de *P. gingivalis* indujo un perfil M1 en macrófagos, aunque menor al inducido al control positivo LPS de *Escherichia coli*, evidenciado en aumentos en la expresión de marcadores de superficie y en los niveles de citoquinas secretadas. Sin embargo, el LPS de *P. endodontalis* no indujo un perfil de macrófagos M1 e indujo bajos niveles de secreción de citoquinas. Por otro lado, ni el LPS de *P. gingivalis* ni el de *P. endodontalis* indujeron cambios en la expresión de TLR2 o TLR4.

**Conclusión:** La periodontitis apical sintomática se asocia con una respuesta pro-inflamatoria con predominio del perfil M1 de macrófagos. Este perfil estaría en parte determinado por la respuesta inmune inducida lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* en macrófagos.

## II. ABSTRACT

**Hypothesis:** The clinically symptomatic form of apical periodontitis is associated with a pro-inflammatory response and a predominant M1 macrophage polarization. This pro-inflammatory profile and the TLR2 and TLR4 expression is determined in part by *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide.

**Results:** We characterized the M1 or M2 polarization profile of macrophages from apical lesions of endodontic origin (ALEO) from patients with symptomatic apical periodontitis (SAP), asymptomatic apical periodontitis (AAP) and healthy periodontal ligament (HPL) by flow cytometry. Our results reveals that macrophages phenotypically exhibit a reduce M2 polarization profile in SAP compared to AAP and HPL. Functionally, SAP exhibit higher levels of M1 cytokine mRNA and reduction of TGF- $\beta$  mRNA in SAP over AAP and HPL. The results suggest an increased M1 macrophage polarization over M2 in SAP compared to AAP.

We also determined the pro- and anti-inflammatory profiles and the expression of TLR2 and TLR4 in human macrophages *in vitro* stimulated with lipopolysaccharide (LPS) from *P. gingivalis* and/or *P. endodontalis*. *P. gingivalis* LPS induced an M1 profile in macrophages, although to a lesser extent compared to the M1 macrophage profile induced by *Escherichia coli* LPS, as positive control, demonstrated by the surface markers expression and the levels of secreted cytokines. However, *P. endodontalis* LPS did not induce an M1 macrophage profile and induced low levels of cytokine secretion. On the other hand, neither *P. gingivalis* LPS nor *P. endodontalis* LPS induced changes in TLR2 or TLR4 expression.

**Conclusion:** Symptomatic apical periodontitis is associated with a pro-inflammatory response with a predominance of the macrophage M1 profile. This profile is partly determined by the immune response induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in macrophage.

### III. ANTECEDENTES

#### III.1 Periodontitis apical crónica

La periodontitis apical es causada por a una infección prevalente del canal radicular que progresa a la formación de una lesión apical osteolítica. Representa una de las causas principales de pérdida dentaria en la población adulta y se ha asociado recientemente con inflamación sistémica y riesgo cardiovascular (Garrido et al., 2019; Garrido et al., 2015; Hernández-Caldera et al., 2017; Paraskevas et al., 2008). La respuesta de los tejidos periapicales se manifiesta como una lesión tisular localizada con signos bien definidos de inflamación crónica en respuesta a una biopelícula dominada por bacterias Gram negativo anaeróbicas y sus respectivos subproductos (Nair, 2004; Rocas et al., 2011).

La formación de una lesión apical de origen endodóntico (ALEO por sus siglas en inglés) corresponde al sello distintivo de las formas crónicas de periodontitis apical (PAC) (Hargreaves et al., 2012). ALEO se caracteriza por la reabsorción ósea perirradicular, detectable como un área radiolúcida en una radiografía periapical. Desde un punto de vista histológico, la ALEO corresponde en su mayoría a granuloma apical o quiste radicular inflamatorio, ambos compuestos por tejido conectivo vascular con infiltración mononuclear (Gutmann et al., 2009). Las PAC son heterogéneas también desde un punto de vista clínico y pueden variar con el tiempo entre dos entidades clínicas principales, PA asintomática (PAA) y sintomática (PAS). **Se ha propuesto que esta última correspondería a una forma activa de PAC (Salinas-Muñoz et al., 2017). Si bien se propone que esta variabilidad clínica dependería del equilibrio dinámico entre los consorcios bacterianos y la respuesta inmune del hospedero (Buonavoglia et al., 2013; Gutmann et al., 2009; Hsiao et al., 2012), esta última sería la determinante principal del desarrollo y la evolución de la ALEO. Sin embargo, se desconoce el rol de la variabilidad en la composición de la biopelícula y el perfil de respuesta inmune en el desarrollo de la forma sintomática de la enfermedad.**

#### III.2 Papel del lipopolisacárido de *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis*

Se ha detectado una gran variedad de especies bacterianas asociadas a infecciones apicales (Marchesan et al., 2016; Paster et al., 2006). Sin embargo, las bacterias pigmentadas de negro, tales como especies de los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* (Seol et al., 2006), han sido reconocidas como agentes centrales para el desarrollo y la progresión de la periodontitis apical



(Seol et al., 2006). Entre ellas, destaca *Porphyromonas gingivalis*, especie clasificada como patobionte altamente prevalente en periodontitis apical crónica (Silva et al., 2008).

Recientemente, se ha propuesto que otras especies relativamente menos estudiadas, como *Porphyromonas endodontalis*, relacionada filogenéticamente con *P. gingivalis*, poseería un papel preponderante en el desarrollo de la PAC (Belstrom et al., 2014; Colombo et al., 2012; Perez-Chaparro et al., 2014). Esto se explica en parte, debido a que el lipopolisacárido (LPS) de *P. endodontalis*, al igual que el de *P. gingivalis*, promueve respuestas pro-inflamatorias y osteolíticas (Mirucki et al., 2014). En un estudio realizado por Pereira et al., en población brasileña, se determinó que la prevalencia de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* en el canal radicular alcanza un 74% y 70%, respectivamente (Pereira et al., 2011). Interesantemente, en el contexto de la periodontitis crónica, se ha demostrado que niveles bajos de colonización de *P. gingivalis* conducen a cambios en la biomasa y composición de la biopelícula subgingival, proceso conocido como disbiosis, que lleva consigo a cambios en los patrones de respuesta inflamatoria y resorción ósea (Hajishengallis et al., 2012; Hajishengallis and Lamont, 2012; Hajishengallis et al., 2011). Consecuentemente, *P. gingivalis* y *P. endodontalis* podrían estar involucradas en el establecimiento y variabilidad clínica de enfermedades relacionadas, como la PAC. Todo lo anterior apunta a que tanto *P. gingivalis* como *P. endodontalis* se podrían identificar como patógenos claves en la periodontitis apical, tanto por sus factores de virulencia, como por su alta prevalencia (Montagner et al., 2012; Rocas et al., 2011).

Dentro los factores de virulencia de *Porphyromonas* spp. se incluyen fimbrias, cápsulas, proteínas de membrana externa, proteasas y el LPS. La expresión diferencial de estos factores de virulencia podría explicar los diferentes espectros de severidad de la enfermedad y el tipo de respuesta inflamatoria del hospedero (Wang et al., 2010). Entre éstos, el LPS corresponde a un glicolípido complejo presente en la membrana externa de bacterias Gram negativo y está compuesto por tres dominios unidos covalentemente: lípido A o endotoxina, que está inserto en la membrana externa de la bacteria, el núcleo central de oligosacáridos o “core” y el antígeno O (OAg), la parte más externa y variable de la molécula. El LPS posee la función de mantener la integridad estructural de la membrana plasmática, así como de regular la entrada de moléculas hidrófobas y compuestos tóxicos (Silhavy et al., 2010). En relación con PAC, se ha observado mayores concentraciones de endotoxina en lesiones endodónticas clínicamente sintomáticas por sobre lesiones endodónticas asintomáticas (Horiba et al., 1991).

El LPS de *P. gingivalis* es un importante factor de virulencia entre los periodontopatógenos, dado que se ha observado que activa la respuesta inflamatoria del hospedero e interviene en el proceso de remodelación ósea en humanos (Herath et al., 2016; Kato et al., 2014; Mirucki et al., 2014). Asimismo, el interés por el estudio de los factores virulencia de *P. endodontalis*, en particular del LPS, ha ido ganando un creciente interés en vista a su relevancia en la etiopatogenia de la PAC (Marchesan et al., 2016). Así, se ha demostrado que el LPS de *P. endodontalis*, de modo similar al de *P. gingivalis*, posee actividad pro-inflamatoria y osteolítica (Mirucki et al., 2014; Papadopoulos et al., 2013; Tang et al., 2011). Particularmente, se ha reportado que la exposición de líneas celulares osteoblásticas de ratón al LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 reduce la viabilidad de éstos, induce la expresión las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 mediada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), y estimula la osteoclastogénesis y la resorción ósea en el modelo de calvaria de ratón (Guo et al., 2014; Yu et al., 2014). No obstante, a la fecha no existen estudios que comparen los efectos biológicos de ambos en el contexto de la PAC.

**Siendo que *P. endodontalis* y *P. gingivalis* coexisten con alta frecuencia en PAC (Pereira et al., 2011), y debido a la naturaleza polimicrobiana de la enfermedad y la exposición conjunta de los macrófagos a los diferentes componentes bacterianos, es importante investigar el efecto combinado de los factores de virulencia provenientes de estas bacterias y una posible efecto sinérgico sobre la respuesta de las células del sistema inmune.**

### **III.3 Receptores tipo Toll median la respuesta inflamatoria de macrófagos**

La naturaleza, alcance y duración de la respuesta inmune frente a la infección endodóntica son los principales determinantes de la degradación del tejido apical en PAC (Azuma, 2006; Buonavoglia et al., 2013; Gazivoda et al., 2009; Sima and Glogauer, 2013). Los macrófagos residentes son a menudo la primera célula inmune en entrar en contacto con los microorganismos. La activación de los macrófagos se inicia mediante el reconocimiento de los receptores tipo Toll (TLR) con patrones moleculares asociados a patógenos bacterianos (PAMP), como LPS liberados de bacterias Gram negativo (Papadopoulos et al., 2013). La unión de TLR al ligando conduce a la activación de los macrófagos y desencadena una variedad de funciones, incluidas la fagocitosis y la producción de mediadores inflamatorios, como citoquinas, especies reactivas de oxígeno y metaloproteinasas de matriz (MMP), así como la activación de respuestas humorales y celulares (Dezerega et al., 2012; Holden et al., 2014; Sima

and Glogauer, 2013). Esta serie de eventos es esencial para el proceso inflamatorio, la respuesta inmune, la homeostasis ósea y la remodelación tisular.

El LPS de *Escherichia coli* ha sido ampliamente estudiado en el contexto de su interacción con TLR4. Por otro lado, se ha reportado que el LPS de *P. endodontalis* actuaría tanto sobre TLR4 como TLR2 en osteoblastos de ratón, pero su actividad sería más preponderante sobre TLR2 (Tang et al., 2011), de modo similar a lo descrito previamente para *P. gingivalis* (Papadopoulos et al., 2013). En línea con lo anterior, se ha reportado una expresión significativamente más alta de TLR2 en PAS en comparación con PAA (Desai et al., 2011), como también se ha descrito un aumento de la expresión de TLR2 inducido por LPS de *P. gingivalis* en macrófagos diferenciados a partir de monocitos THP-1 (Martin et al., 2001). **Estos antecedentes sugieren que TLR2 podrían mediar la respuesta inflamatoria y reabsorción ósea inducida por LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis* en macrófagos durante la PAC.**

Se ha observado en periodontitis que ARNm TLR2 estaría sobre-expresado en tejido gingival de pacientes con periodontitis en comparación a pacientes sanos, y este aumento se asociaría positivamente a la biomasa de *P. gingivalis* en la biopelícula subgingival (Wara-aswapati et al., 2013). Más aún, la regulación génica de TLRs podría estar mediada por mecanismos epigenéticos frente al estímulo bacteriano (Beklen et al., 2008; Fatemi et al., 2013; Mori et al., 2003; Promsudthi et al., 2013; Rojo-Botello et al., 2012; Sugawara et al., 2006). En lesiones periapicales, el aumento de los niveles de ARNm TLR2 en PAS sobre PAA, estaría asociado con una desmetilación del promotor de TLR2, lo cual no sería válido para TLR4 (Fernández et al., 2020). Por otro lado, se ha observado que la exposición crónica a *P. gingivalis* en un modelo experimental *in vitro* indujo la hipermetilación del promotor de TLR2 junto con la regulación del ARNm en las células epiteliales gingivales humanas, explicando parcialmente el fenotipo inmunitario hiporreactivo atribuido a la infección persistente por este patógeno (Benakanakere et al., 2015).

**De este modo, la estimulación bacteriana mediada por LPS podría regular el perfil de respuesta inflamatoria y niveles de expresión, particularmente de TLR2. Sin embargo, se desconoce el posible rol del LPS de *P. endodontalis* y/o *P. gingivalis* sobre la regulación de la expresión de TLR2 en macrófagos.**

#### **III.4 Plasticidad de macrófagos**

Los macrófagos son una población celular heterogénea que muestra una amplia plasticidad y diferenciación dinámica (Sima and Glogauer, 2013). En respuesta a citoquinas y activación a través de TLRs, los macrófagos se polarizarán hacia los fenotipos funcionales principales M1 (clásico) o M2 (alternativo). Los macrófagos se polarizan a M1 como resultado de la vía de activación clásica desencadenada principalmente por interferón (IFN)- $\gamma$ . Esto resultará en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-23, con aumento de su capacidad microbicida y de presentación de antígenos (Derlindati et al., 2015). Por otro lado, los macrófagos M2 son el resultado de la exposición a IL-4/IL-13 (M2a), complejos inmunes (M2b) o IL-10 (M2c), y están involucrados en la modulación del sistema inmune y reparación, secreción de citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-10, IL-1RA y TGF- $\beta$ , pero son deficientes en la presentación de antígeno y la destrucción microbiana (Ortiz et al., 2015).

Los macrófagos M1 promueven las respuestas inflamatorias Th1 y Th17, que están estrechamente asociadas con la destrucción del tejido periodontal marginal y apical, a través de la secreción de IL-12 e IL-17, respectivamente (Hernández et al., 2011). Por otro lado, los macrófagos M2 interactúan con las respuestas Th2 y Tregs, consideradas respuestas protectoras del periodonto. El desequilibrio en los fenotipos funcionales de macrófagos puede conducir a cambios patológicos (Derlindati et al., 2015; Sima and Glogauer, 2013). En este sentido, se ha demostrado que la infiltración de macrófagos M1 induce la destrucción del tejido periodontal en un modelo murino de periodontitis inducida por LPS de *P. gingivalis* (Lam et al., 2014). Sin embargo, se desconoce la naturaleza de la respuesta inmune mediada por macrófagos en pacientes con PAC. No obstante, se ha reportado que citoquinas/quimioquinas asociadas a M1, como TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 y/o IL-8, aumentan sus niveles en lesiones apicales sintomáticas y lesiones de gran tamaño en comparación con lesiones asintomáticas o de menor tamaño (Azuma, 2006; Gazivoda et al., 2009). **Estos antecedentes sugieren una asociación entre el fenotipo M1 de los macrófagos, la progresión de la PAC y sus manifestaciones clínicas.**

**En resumen, la respuesta inmune mediada por macrófagos es central en el desarrollo, progresión y manifestaciones clínicas de la PAC, esta respuesta parece variar en respuesta a diferentes estructuras bacterianas a través de su ligación con receptores TLR2. En consecuencia, es importante evaluar el papel del LPS de dos especies prevalentes en la infección endodóntica como lo son *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, así como su rol en la respuesta mediada por macrófagos. Este conocimiento contribuirá a desentrañar la complejidad de la interacción entre los patógenos endodónticos, la respuesta inmune y su**

**rol en la presentación clínica de la PAC; por otro lado, la modulación de la respuesta pro-inflamatoria inducida por la ligación a TLR2 a diferentes estructuras bacterianas emerge como alternativa para tratar reacciones inflamatorias adversas tanto a nivel periradicular como a nivel sistémico.**

#### IV. Hipótesis

La forma clínicamente sintomática de periodontitis apical se asocia con una respuesta pro-inflamatoria con predominio del perfil M1 de macrófagos. Este perfil de respuesta y la expresión del receptor TLR2 y TLR4 está determinado en parte, por el lipopolisacárido de *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis*.

#### V. Objetivos Generales

V.1 Caracterizar el perfil de polarización de macrófagos en lesiones apicales de pacientes con periodontitis apical sintomática, asintomática y controles sanos.

V.2 Determinar los perfiles pro- y anti-inflamatorios de macrófagos estimulados con LPS de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* y la combinación de ambos.

#### VI. Objetivos Específicos

VI.1. Caracterizar los perfiles de diferenciación de macrófagos M1 y M2 y expresión génica de citoquinas asociadas en lesiones apicales provenientes de pacientes con periodontitis apical sintomática, asintomática y ligamentos sanos.

VI.2. Determinar *in vitro* los perfiles de diferenciación y expresión de citoquinas en macrófagos diferenciados de THP-1 estimulados con LPS de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* y la combinación de ambos.

VI.3. Determinar *in vitro* los niveles de TLR2 y TLR4 de superficie celular y sus transcritos en macrófagos diferenciados de THP-1 y estimulados con LPS de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* y la combinación de ambos.

## VII. METODOLOGIA

**Objetivo 1:** Caracterizar los perfiles de diferenciación de macrófagos M1 y M2 y expresión génica de citoquinas asociadas en lesiones apicales provenientes de pacientes con periodontitis apical sintomática, asintomática y ligamentos sanos.

### VII.1 Muestras de LA

Ligamentos periodontales de dientes sanos y ALEO de pacientes con diagnóstico clínico de PAA o PAS fueron obtenidos según los criterios establecidos previamente (Gutmann et al., 2009), a partir de voluntarios con indicación de extracción dental atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y en la Facultad de Odontología de la Universidad Andrés Bello. Los criterios de inclusión fueron tener al menos un diente diagnosticado con periodontitis apical y una radiografía apical con un área radiolúcida apical  $\geq 3$  mm. Pacientes que reportaron dolor a la percusión fueron diagnosticados como PAS, aquellos que no presentaran sintomatología clínica fueron diagnosticados como PAA (Gutmann et al., 2009). Se excluyeron individuos con enfermedad sistémica, o uso de antibióticos o anti-inflamatorios no esteroideos durante un período de 3 meses antes del estudio. Todos los protocolos y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile en el Informe N°2016/08 y están de acuerdo con los estándares éticos de la Declaración de Helsinki (Ver Actas Anexo).

### VII.2 Caracterización M1/M2 mediante citometría de flujo

Para caracterizar la expresión de marcadores de superficie para M1/M2 desde ligamentos periodontales (n=5), ALEO de PAA (n=16) o PAS (n=17), las lesiones fueron trituradas en placa de Petri con bisturí estéril y digeridas por 90 min con 0,2 U/mL de colagenasa tipo IV (Thermo Fisher) y 10 U/mL de ADNasa I (Thermo Fisher) a 37°C. La suspensión de células obtenidas fue filtrada con un filtro celular de 0,70  $\mu\text{m}$ . Las células fueron incubadas con buffer de hemolisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  15 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM) por 5 min a 37°C y después lavadas con 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) suplementado con Suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Thermo Fisher). Al menos  $2 \times 10^5$  células se incubaron con tinción de viabilidad (Fixable Viability Dye eFluor 780) (Invitrogen) durante 30 minutos a 4°C y con diluciones apropiadas de anticuerpos anti CD14 (macrófagos), CD64 y CD80 para M1, y CD163 y CD206 para M2 (Ambarus et al., 2012; Barros et al., 2013; Ortiz et al., 2015), según las indicaciones del fabricante (Anexo Tabla 1). Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído al 2% y se caracterizaron mediante citometría de flujo. Se evaluó la presencia

de macrófagos M1 y M2 como también posibles subpoblaciones que expresaran tanto marcadores de M1 como M2. La citometría de flujo se realizó en un equipo BD LSRFORTESSA X-20 y se analizó usando el software Flow Jo V10.

### VII.3 Niveles transcripcionales de citoquinas

Para la determinación de los niveles de ARNm de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-10 y TGF- $\beta$  (M2), se extrajo ARNm a partir de ligamentos sanos (n=9) y ALEO de pacientes con PAA (n=35) o PAS (n=28) por medio de homogeneización automatizada y el kit de extracción AllPrep DNA/RNA/Protein mini Kit (Qiagen). La concentración se cuantificó en un espectrofotómetro SinergyHT (Biotek).

El ADNc se sintetizó usando el kit de transcriptasa reversa (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR with dsDNase). Para cuantificar la expresión de ARNm de las citoquinas de interés, el ADNc se amplificó usando los partidores en la tabla 2 (Anexo) y el reactivo KAPA SYBR Fast qPCR. Los niveles de ARNm se calcularon con el método relativo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y se normalizaron con respecto a los niveles de 18S ARNr. El análisis estadístico se realizó con el ensayo Kruskal-Wallis.

**Objetivo 2:** Determinar *in vitro* los perfiles de diferenciación y expresión de citoquinas en macrófagos diferenciados de THP-1 estimulados con LPS de *P. endodontalis*, *P. gingivalis* y la combinación de ambos.

### VII.4 Purificación de LPS

Se purificó LPS a partir de cepas de referencia de *P. gingivalis* (ATCC 33277) y *P. endodontalis* (ATCC 35406), y de aislados clínicos de *P. gingivalis* (AC1Pg) y *P. endodontalis* (AC2Pe) previamente obtenidas de pacientes con PAC, de acuerdo con los criterios descritos en el objetivo 1. *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, fueron cultivadas en cámara de anaerobiosis en una atmósfera 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub> (Shell Lab), en placas agar sangre suplementado con hemina-menadiona (5  $\mu$ g/mL) por 4-7 días. Se subcultivaron en caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) suplementado con hemina-menadiona (5  $\mu$ g/mL), y se crecieron hasta fase exponencial tardía. El LPS fue purificado mediante una modificación del protocolo de extracción con TRIzol (Yi and Hackett, 2000). El pellet obtenido a partir de un cultivo de 50 mL se incubó con ADNasa (0,1 mg/mL) y ARNasa (0,2 mg/mL) a 37°C durante toda la noche (Rezania et al., 2011) y luego con proteinasa K (1 mg/mL) a 60°C por 1,5 horas, se



homogeneizó en 2 mL de TRIzol y 400 µl de cloroformo y se centrifugó a 3900 x g por 10 min. La fase superior acuosa se recuperó y liofilizó durante toda la noche. El producto liofilizado se disolvió en 0,375 M de cloruro de magnesio en etanol 95% frío, se centrifugó a 4700 x g por 5 min y se recuperó el precipitado. Se comprobó su pureza con ensayo de Bradford y gel de agarosa teñido en GelRed para detección de proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente. Las muestras se visualizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con plata (Marolda et al., 2006; Tsai and Frasch, 1982), al que se cargó estándar de peso molecular (#P7706S BioLabs). Adicionalmente, se determinó la capacidad endotóxica de los LPS purificados por medio de Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher) y se utilizó el ensayo de Purpald para medir Ácido 3-desoxi-D-manno-oct-2-ulosónico (KDO), componente del core de LPS, para caracterizar los LPS purificados (Marolda et al., 2006). Como control positivo, se utilizó LPS ultrapuro de *P. gingivalis* ATCC 33277 de origen comercial (Invivogen).

#### VII.5 Diferenciación y estimulación de macrófagos a partir de células THP-1

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células THP-1 (ATCC TIB-202) por pocillo, se diferenciaron a macrófagos con 10 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células no adheridas se removieron y las adherentes se lavaron e incubaron por 24 horas con en medio RPMI con FBS 10%.

Los macrófagos se estimularon con 10 µg/mL del LPS de *P. gingivalis*, *P. endodontalis* o ambos (grupo experimental) por 24 horas para evaluar la secreción proteica (Maess et al., 2013; Takashiba et al., 1999). Como control negativo, se usaron células sin estimular; como control positivo, se usaron células estimuladas con LPS de *E. coli* O127:B8 (10 ng/mL) (Sigma-Aldrich).

Se caracterizó la diferenciación M1/M2 mediante citometría de flujo, ya descrita en la metodología del objetivo 1, y los niveles de citoquinas secretadas IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-1RA en cultivos *in vitro* mediante un panel comercial Multiplex en plataforma Luminex.

**Objetivo 3:** Determinar *in vitro* los niveles de TLR2 y TLR4 de superficie celular y sus transcritos en macrófagos diferenciados de THP-1 y estimulados con LPS de *P. endodontalis*, *P. gingivalis* y la combinación de ambos.

## VII.6 Determinación de niveles de TLR2 y TLR4

Se determinaron los niveles relativos de ARNm de TLR2 y TLR4 por qRT-PCR, usando el partidor presentado en la tabla 2 del anexo, y la expresión proteica en superficie por citometría de flujo en macrófagos estimulados con los LPS de *P. gingivalis* (10 µg/mL), *P. endodontalis* (10 µg/mL) y combinación de ambos LPS como grupos experimentales, según se describe en el OE2. Como control negativo se utilizaron las células sin estimular y como controles positivos, las células estimuladas con LPS de *E. coli* O127:B8 (10 ng/mL), agonista TLR4, o lipopéptido triacetilado sintético (PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, 10 ng/mL, InvivoGen), agonista TLR2. El tiempo de estimulación se estableció en 2 horas, tras realizar una curva tiempo-respuesta basada en la expresión de mRNA de IL-1β, en la que se evidenció un aumento del transcrito a las 2 horas de estímulo para todas las condiciones experimentales por sobre el control sin estimular; para posteriormente disminuir a las 6 y 24 horas.

Adicionalmente, con el fin de explorar si la expresión génica de TLR frente a LPS pudiera estar sujeta a regulación epigenética por metilación, los distintos grupos experimentales y controles se trataron con el agente hipometilante del ADN, 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) (Sigma-Aldrich) 500 nM o con medio como control por 24 horas (Hollenbach et al., 2010; Stresemann et al., 2006), posteriormente fueron lavadas con PBS y estimuladas con LPS por 2 horas y se midieron los niveles transcripcionales de TLR2 y TLR4 por qRT-PCR.

El análisis estadístico de los resultados correspondientes se realizó con test ANOVA o Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos.

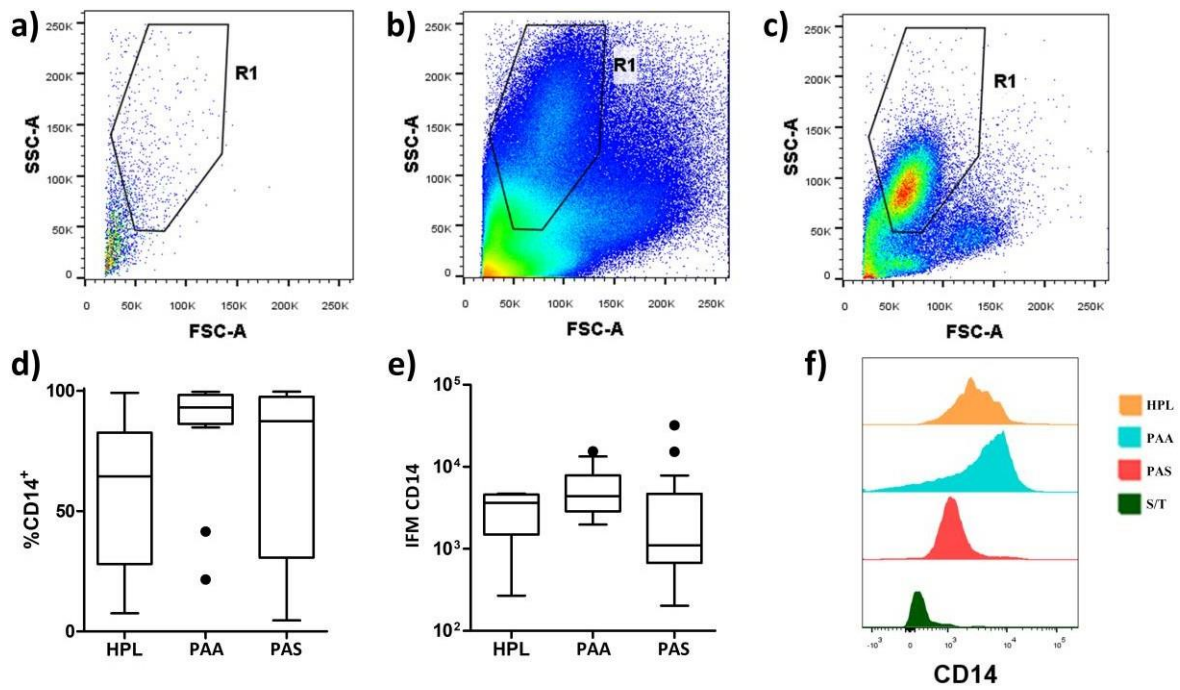
## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 Caracterización de los perfiles de diferenciación de macrófagos M1 y M2 y expresión génica de citoquinas asociadas en lesiones apicales provenientes de pacientes con periodontitis apical sintomática, asintomática y ligamentos sanos

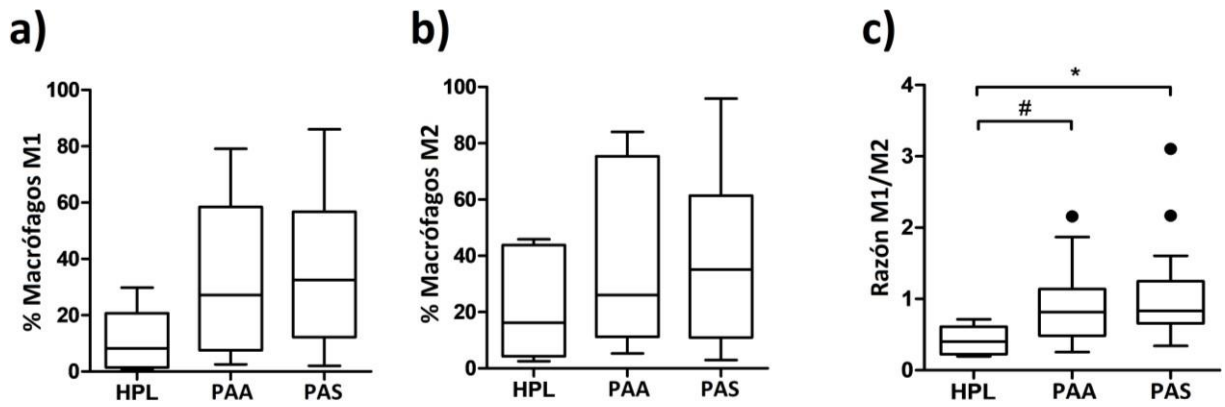
#### VIII.1.1 Perfil fenotípico de macrófagos es predominante M1 en periodontitis apical sintomática

A partir de ligamento periodontal sano (HPL por sus siglas en inglés) y lesiones apicales de pacientes con PAA y PAS, se realizó marcaje con anticuerpos anti-CD14 como marcador general de macrófagos, anti-CD64 y anti-CD80 como marcadores de macrófagos M1 y anti-CD163 y anti-CD206 como marcadores de M2. Se analizaron las poblaciones por medio de citometría de flujo. Con el propósito de analizar las diferentes poblaciones, se realizó un *gate* en *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC) (R1), tal como se presenta en Figura 1 (A, B y C). Sobre la población R1 seleccionada, se determinó la frecuencia (mediana) de las células CD14<sup>+</sup> en HPL control, PAA y PAS, resultando en un 64,4%, 93,2% y 87,4% respectivamente (Figura 1D), observándose una tendencia a ser más altas en lesiones asintomáticas y sintomáticas, en comparación con los controles de individuos sanos.

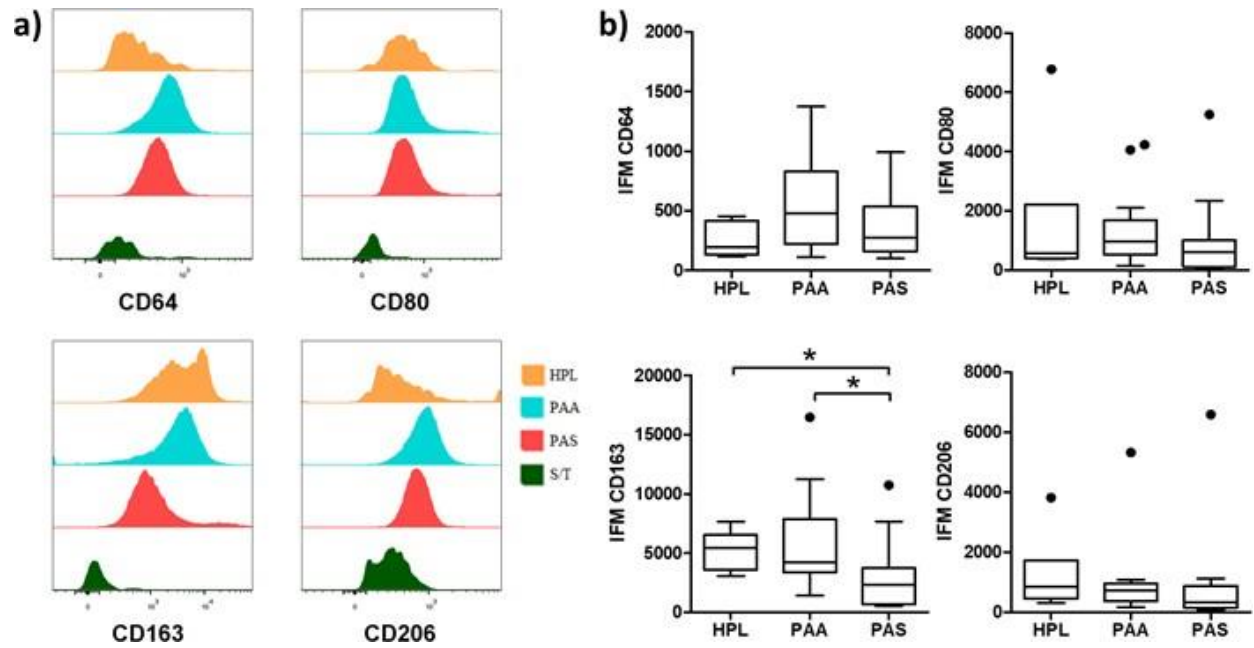
El análisis de los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) para la expresión de CD14 no muestra diferencias significativas entre cualquiera de las condiciones estudiadas (Figura 1E y F).



**Figura 1. Identificación de monocitos/macrófagos en lesiones apicales endodónticas y controles sanos.** Se analizó la población en función al *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC) (región R1). *Dot plot* representativos de a). Ligamento periodontal sano (HPL), b). Periodontitis apical asintomática (PAA) y c). Periodontitis apical sintomática (PAS). Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de d). Porcentaje de células CD14<sup>+</sup> en la región R1 y E. Intensidad de la fluorescencia media (IFM) CD14 sobre las células en región R1. F. Histogramas representativos de IFM de CD14. S/T, sin teñir. Los datos fueron analizados por test Kruskal Wallis.



**Figura 2. Porcentajes de las poblaciones de macrófagos M1 y M2 en las lesiones apicales endodónticas y controles sanos.** Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD14, anti-CD64, anti-CD80, anti-CD163 y anti-CD206 como se describió en Materiales y Métodos. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de A. Porcentaje de células CD64<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> para cuantificar macrófagos M1, B. CD163<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> para cuantificar macrófagos M2 sobre la población total de células CD14<sup>+</sup>, C. Relación M1/M2 de HPL, PAA y PAS. HPL ligamento periodontal sano; PAA Periodontitis apical asintomática; PAS periodontitis apical sintomática. Los datos se analizaron mediante test Kruskal Wallis. \* p < 0,05, # p = 0,0098 para un valor p ajustado = 0,0083.

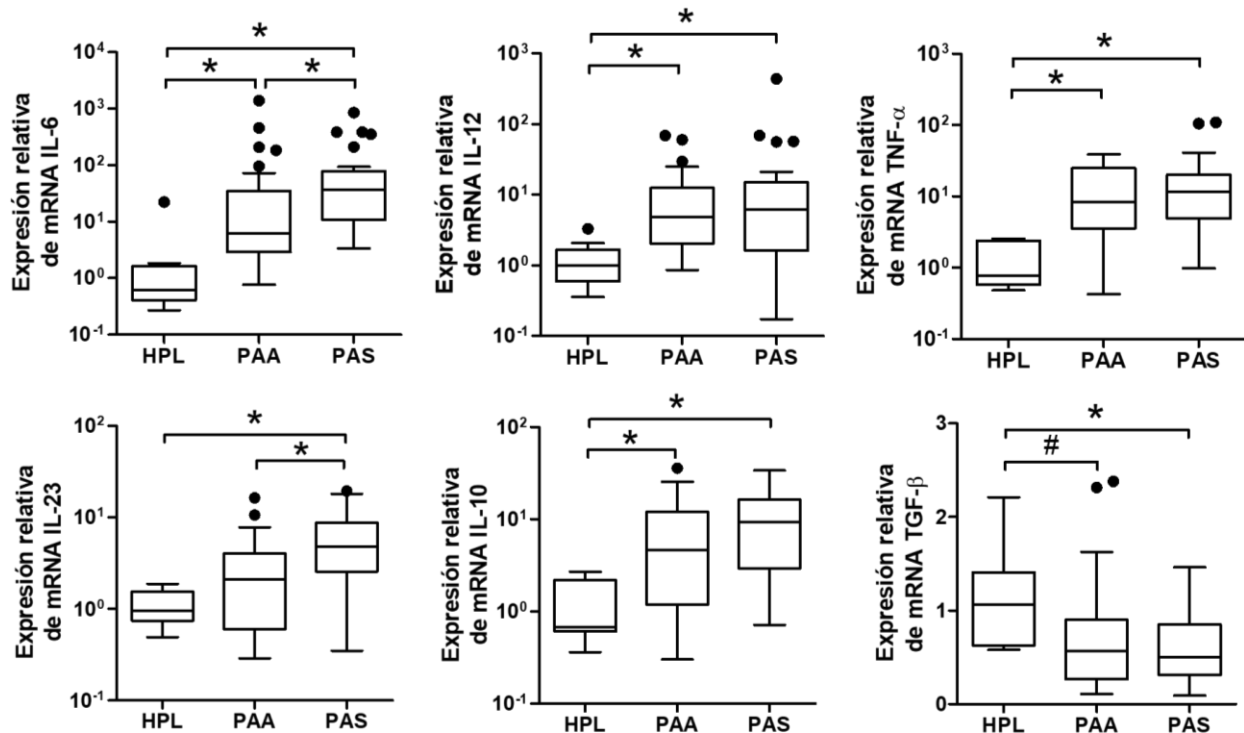


**Figura 3. Expresión de marcadores M1 y M2 de lesiones apicales endodónticas.** A. Histogramas representativos de IFM para marcadores de macrófagos M1 y M2 de células CD14<sup>+</sup>. HPL Ligamento periodontal sano; PAA Periodontitis apical asintomática; PAS Periodontitis apical sintomática; S/T Sin Teñir, B. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de la Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD64, CD80, CD163 y CD206 sobre células CD14<sup>+</sup> en controles sanos y lesiones apicales endodónticas. Los datos fueron analizados por test Kruskal Wallis \* p <0,05.

A partir de las células CD14<sup>+</sup>, se caracterizaron las diferentes subpoblaciones de macrófagos. Se seleccionaron células doble positivas para marcadores de macrófagos M1 (CD64<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>) y marcadores de macrófagos M2 (CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>). El porcentaje de macrófagos M1 en HPL control fue de 8,2%, mientras que en PAA y PAS fue de 27,2% y 32,5% respectivamente (Figura 2 A y B). Estos resultados muestran una tendencia hacia un perfil M1 en ambas formas de PA en comparación con individuos sanos. También se observó una tendencia similar para macrófagos M2, el porcentaje medio de macrófagos M2 en HPL control fue 16,2%, mientras que en PAA fue de 26,1% y en PAS fue de 35,2%.

El balance entre las subpoblaciones de macrófagos estudiadas se calculó como la razón entre M1/M2, la cual en HPL control fue de 0,40 en individuos sanos, mientras que en PAA y PAS fue de 0,81 y 0,83 respectivamente, mostrando una relación M1 / M2 significativamente mayor en PAS en comparación con los controles de HPL ( $p < 0,05$ ). En el caso de PAA, se observó una relación M1/M2 más alta, levemente significativa, al comparar con controles de HPL ( $p = 0.0098$  para valor  $p$  ajustado a 0.0083) (Figura 2C).

Al analizar la IFM para los marcadores de las distintas subpoblaciones de macrófagos, se observó que la expresión de los marcadores de superficie para macrófagos M1, CD64 y CD80 se mantuvo en niveles similares (Figura 3A) y su media no difirió significativamente entre ninguna de las diferentes condiciones (Figura 3B). Sin embargo, los niveles de los marcadores de macrófagos M2, CD163 y CD206, tendió a expresarse a la baja progresivamente en el siguiente orden, HPL control, PAA y PAS. Notablemente, la expresión de CD163 disminuyó significativamente en PAS en comparación con PAA y HPL control (Figura 3A y B) ( $p < 0,05$ ). **En resumen, PAS mostró una menor polarización de macrófagos M2 sobre PAA y controles sanos.**



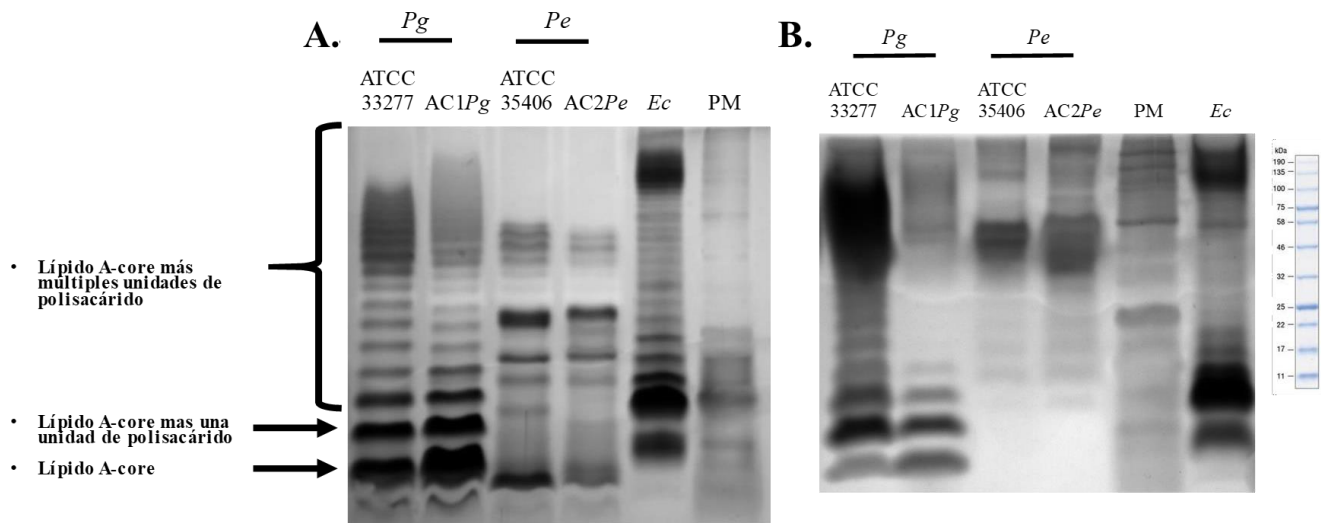
**Figura 4. Expresión génica de citoquinas en lesiones apicales endodónticas y controles sanos.** Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de la expresión génica relativa de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-23) y anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- $\beta$ ). Esta fue normalizada en relación con 18S ARNr y expresado como la diferencia entre  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . HPL ligamento periodontal sano; PAA Periodontitis apical asintomática; PAS periodontitis apical sintomática. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis \*  $p < 0,05$ , #  $p = 0,0098$  para un valor  $p$  ajustado = 0,0083.



### **VIII.1.2 Perfil de expresión de citoquinas en macrófagos es predominante M1 en periodontitis apical sintomática**

Se determinaron los niveles de ARNm de citoquinas en PAA, PAS y HPL control por medio de qPCR (Figura 4). En el caso de citoquinas M1, los niveles de expresión de IL-6 fueron los más altos en PAS, seguidos por PAA y los más bajos se dieron en HPL ( $p < 0,05$ ). Los niveles de expresión de IL-12 y TNF- $\alpha$  fueron mayores en PAS y PAA en comparación con HPL control ( $p < 0,05$ ). El ARNm IL-23 fue significativamente más alto en PAS comparado a PAA y HPL ( $p < 0,05$ ). En el caso de las citoquinas M2, el ARNm IL-10 fue más alto en PAS y PAA comparado a HPL control ( $p < 0,05$ ); mientras que los transcritos de TGF- $\beta$  fueron los más bajos en PAS comparado a HPL control ( $p < 0,05$ ) mientras que la disminución del transcrito de TGF- $\beta$  en PAA comparado a HPL control fue levemente significativa ( $p = 0.0085$  para valor  $p$  ajustado a 0.0083). **En resumen, PAA presenta un balance de citoquinas asociado a M1 comparado a HPL. PAS presenta un balance de citoquinas M1 de tipo pro-inflamatorias en comparación a HPL y PAA, encontrándose los ARNm de citoquinas IL-6 e IL-23 significativamente aumentados en PAS en comparación con PAA.**

**En conclusión, las lesiones apicales muestran un perfil de polarización de macrófagos predominantemente M1, determinado por la expresión de marcadores de superficie, que resulta más evidente en periodontitis apical sintomática por sobre periodontitis apical asintomática. Esto es concordante con una mayor expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias por sobre las citoquinas anti-inflamatorias. Estos cambios podrían mediar la progresión y los síntomas asociados con las lesiones apicales endodónticas.**



**Figura 5: Perfiles de lipopolisacáridos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* visualizados en geles de Tris-Tricina teñidos con plata.** A. LPS obtenido a partir de lisados bacterianos. B. LPS purificados. ATCC 33277: cepa de referencia de *P. gingivalis* ATCC 33277; AC1Pg: Aislado clínico de *P. gingivalis*; ATCC 35406: cepa de referencia de *P. endodontalis* ATCC 35406; AC2Pe: Aislado clínico de *P. endodontalis*; Ec: Control LPS comercial *E. coli* (Sigma-Aldrich). PM: Estándar de Peso Molecular.

## VIII.2 Perfiles de diferenciación M1/M2 y citoquinas asociadas en macrófagos estimulados *in vitro* con LPS de *P. endodontalis*, *P. gingivalis* y la combinación de ambos

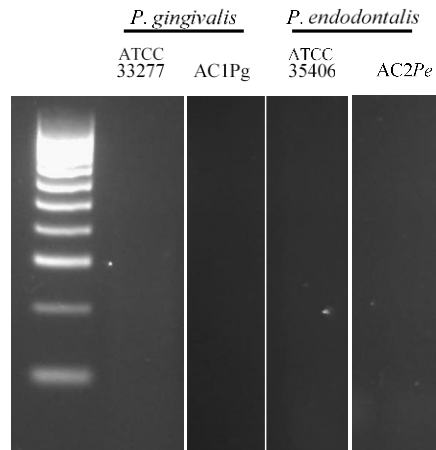
### VIII.2.1 Extracción y purificación del lipopolisacárido de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*

Se trabajó con cepas de referencia de *P. gingivalis* ATCC 33277 y *P. endodontalis* ATCC 35406 y aislados clínicos de *P. gingivalis* (AC1Pg) y *P. endodontalis* (AC2Pe), previamente obtenidos de pacientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. La pureza de los cultivos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* fue confirmada por secuenciación de un fragmento de 763 pb correspondiente a las regiones V3-V6 del gen de 16S ARN (Datos no mostrados). Además, se obtuvieron lisados bacterianos para visualización de LPS a partir de cultivos crecidos hasta fase exponencial y ajustados a una  $DO_{600} = 2,0$  (Bravo et al., 2008; Hoare et al., 2012). Para su visualización, se cargaron 3,2  $\mu$ l de cada lisado en geles de Tris-Tricina teñidos con plata, técnica que posee una sensibilidad hasta de 5 ng de LPS (Tsai and Frasch, 1982). Los perfiles electroforéticos de los LPS observados fueron consistentes con lo esperado para *P. gingivalis* y *P. endodontalis* (Diaz et al., 2015; Paramonov et al., 2005; Rangarajan et al., 2008; Shapira et al., 1998). En el caso de los perfiles electroforéticos de la cepa de referencia *P. gingivalis* ATCC 33277 y su respectivo aislado clínico (AC1Pg), se observa una región de lípido A-core sin sustituir y un largo preferencial de lípido A-core sustituido con más de 8 unidades repetidas de OAg. Por otro lado, los perfiles electroforéticos de *P. endodontalis*, tanto de la cepa de referencia como su respectivo aislado clínico (AC2Pe) presentaron una región de lípido A-core no sustituido por moléculas OAg más tenues que las de *P. gingivalis* y un largo preferencial de 8 a 14 unidades repetidas de OAg (Figura 5A).

Con el fin de obtener LPS puros a partir de cepas de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, se realizó una extracción con TRIzol (Yi and Hackett, 2000), incluyendo un paso de sonicación para asegurar la ruptura de la pared y tratamientos con ADNasaI, ARNasa y proteinasa K.

**A.**

|  |                   |                    |                   |                     |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| Muestras de LPS  | ATCC 33277        | AC1Pg              | ATCC 35406        | AC2Pe               |
| Actividad endotóxica (EU/mL; $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )          | 2487 $\pm$ 903,0  | 512 $\pm$ 319,9    | 266 $\pm$ 181,0   | 94,3 $\pm$ 9,9      |
| Ensayo Purpald ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) | 740,7 $\pm$ 255,6 | 1546,5 $\pm$ 339,5 | 770,8 $\pm$ 288,2 | 5186,8 $\pm$ 1581,0 |
| Proteína (mg/mL)   | <0,01             | <0,01              | <0,01             | <0,01               |

**B.**

**Figura 6: Evaluación de la pureza y actividad endotóxica de LPS.** A. Valores actividad endotóxica obtenidos por ensayo LAL, concentración de KDO por ensayo de Purpald y concentración de proteínas por técnica Bradford, B. Gel de agarosa representativo teñido con GelRed. ATCC 33277: LPS purificado desde cepa de referencia de *P. gingivalis* ATCC 33277. AC1Pg: LPS purificado desde aislado clínico de *P. gingivalis*. ATCC 35406: LPS purificado desde cepa de referencia de *P. endodontalis* ATCC 35406. AC2Pe: LPS purificado desde aislado clínico de *P. endodontalis*.

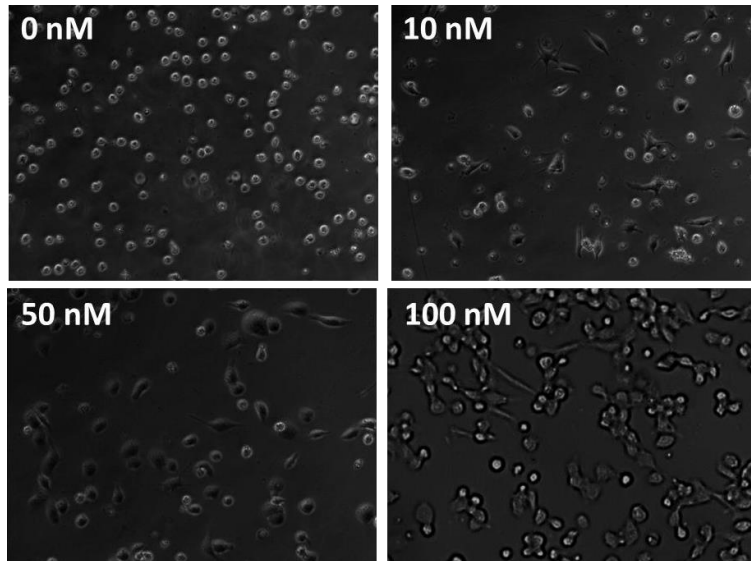
Los LPS obtenidos se cargaron en geles de Tris-Tricina y fueron visualizados con tinción de plata. Los LPS de la cepa de referencia de *P. gingivalis* y su respectivo aislado clínico (AC1Pg) presentaron un perfil electroforético similar al observado en lisados bacterianos. Sin embargo, cabe destacar que al purificar el LPS de *P. endodontalis*, la fracción de lípido A-core no sustituido no fue visible en los geles (Figura 5B). No obstante, tanto en los geles de LPS de *P. endodontalis* realizados a partir de lisados completos, como en los de LPS purificado, encontramos un largo preferencial de OAg de 8 a 14 unidades repetidas (Figura 5).

Adicionalmente, se confirmó que los LPS purificados de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* mantuvieron su actividad endotóxica por medio del ensayo LAL, observándose una actividad endotóxica por sobre los 85 EU/mL en todos los LPS purificados (límite de detección: 0.1 EU/mL). De modo similar, se confirmó la presencia de KDO, componente del core de LPS, en los purificados de LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* (Figura 6A). Finalmente, se descartó contaminación con proteínas, mediante cuantificación por Bradford (Límite de detección Bradford: 0,01 mg/mL) (Figura 6A) y contaminación con ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante visualización en gel de agarosa con GelRed (Límite de detección GelRed: 0,1 ng)(Figura 6B).

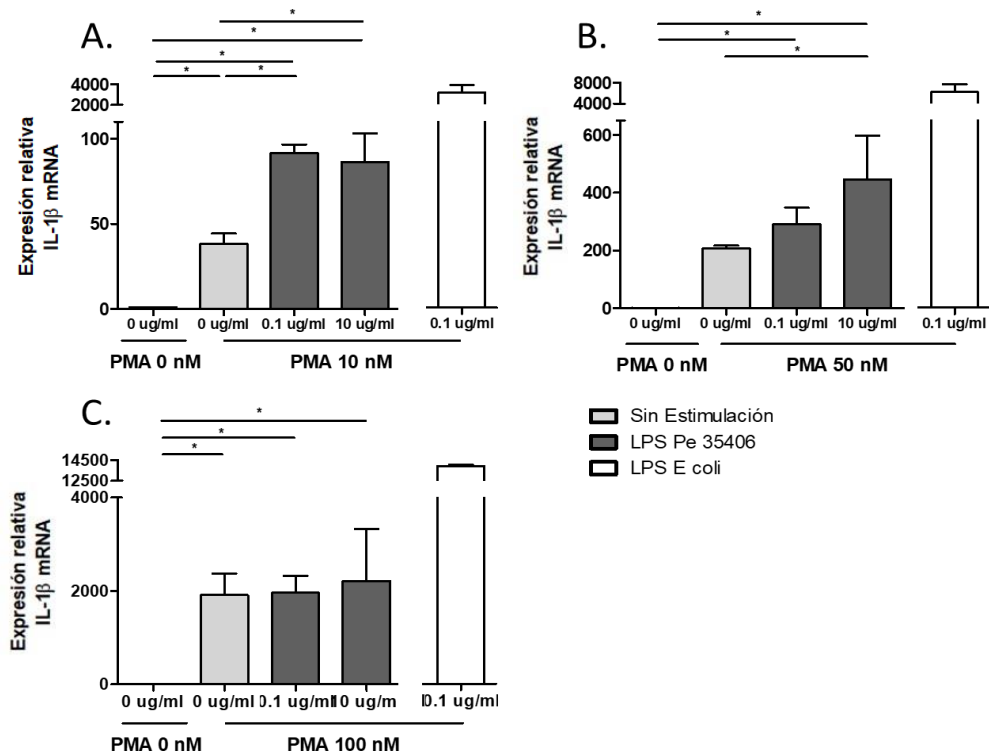
**En conjunto, los resultados indican que los LPS obtenidos conservaron sus componentes estructurales en forma íntegra, además de ser biológicamente activos (basados en sus actividades endotóxicas). Además, estos se encontraron libres de contaminantes (proteínas y ácidos nucleicos). De este modo, los LPS obtenidos fueron utilizados para los experimentos de estimulación de macrófagos diferenciados de THP-1.**

#### **VIII.2.2 Diferenciación de línea celular monocítica humana THP-1 a macrófagos**

Células monocíticas humanas THP-1 se diferenciaron a macrófagos, mediante el tratamiento con diferentes concentraciones de PMA (0, 10, 50 y 100 nM), con el objetivo de establecer la concentración mínima de tratamiento. Posteriormente, las células se estimularon con LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 en distintas concentraciones (0,1 y 10 µg/mL) por 24 horas en triplicado y se evaluaron cambios en la morfología celular y los niveles de ARNm IL-1β.



**Figura 7. Morfología de las células THP-1 diferenciadas con PMA.** Morfología de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) a 0, 10, 50 o 100 nM por 24 horas. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio óptico Axiovert 40 CFL con lente óptico 20X.



**Figura 8. Expresión génica de IL-1 $\beta$  en células THP-1 diferenciadas a macrófagos con A. PMA 10 nM. B. 50 nM. C. 100 nM.** Las células fueron estimuladas con LPS purificado desde *P. endodontalis* ATCC 35406 a 0,1 o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o LPS comercial de *E. coli* 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 horas. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con ARNr 18S y expresado como la diferencia entre  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Se realizó análisis estadístico con los triplicados de células estimuladas con LPS de *P. endodontalis* versus controles no estimulados (n=1). Los datos fueron graficados como media con desviación estándar y analizados mediante test estadístico one-way ANOVA con post-hoc Bonfferoni test. \* p <0,05.

Se observó por microscopía óptica que las células THP-1 estimuladas con PMA, tanto con 10, 50 o 100 nM por 24 horas, se adhirieron al fondo de la placa y formaron protuberancias, adquiriendo así morfología de macrófagos. Por otro lado, células THP-1 sin estimular con PMA, no se adhirieron al fondo de la placa y mantuvieron una morfología esférica (Figura 7).

Los niveles de ARNm IL-1 $\beta$  aumentaron en células diferenciadas con PMA 10 nM y estimuladas con 0,1 y 10  $\mu$ g/mL de LPS de *P. endodontalis* en comparación con los niveles de las células control (PMA 0 nM) y con las células diferenciadas con 10 nM de PMA sin exposición a LPS (Figura 8A).

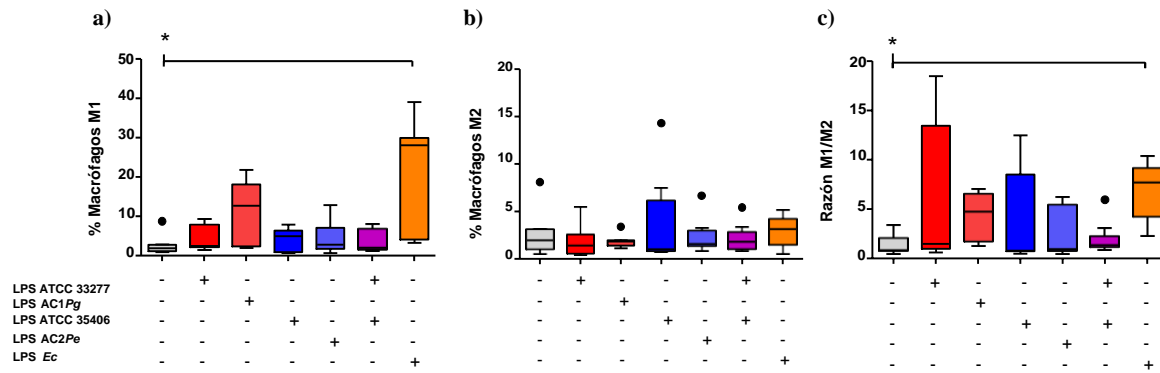
Los niveles de ARNm IL-1 $\beta$  también aumentaron significativamente en las células diferenciadas con PMA 50 nM y estimuladas con 0,1 y 10  $\mu$ g/mL de LPS de *P. endodontalis* comparadas con las células sin diferenciar. Sin embargo, solo las células estimuladas con 10  $\mu$ g/mL de PMA demostraron un aumento estadísticamente significativo comparadas con las células control diferenciadas con PMA 50 nM sin exposición a LPS (Figura 8B).

Sumado a lo anterior, al diferenciar las células con PMA 100 nM, se observaron aumentos en los transcritos de IL-1 $\beta$  comparadas con las células control sin diferenciar con PMA; sin embargo, no se observaron cambios o tendencias claras al ser estimuladas con el LPS de *P. endodontalis* en comparación a las células diferenciadas sin estimular (Figura 8) (Anexo Figura 1).

Las células diferenciadas con PMA y estimuladas con el control positivo, LPS de *E. coli* (0,1  $\mu$ g/mL), evidenciaron un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$  en comparación con la condición de estímulo con 10  $\mu$ g/mL LPS de *P. endodontalis*. Estos resultados confirman reportes previos que establecen que el LPS de *P. endodontalis*, y de modo similar al de *P. gingivalis*, son inmunológicamente menos activos que el LPS de *E. coli* (Reife et al., 2006). La diferenciación con concentraciones de PMA  $\geq$ 50 nM por sí sola induce aumentos significativos de transcritos de IL-1 $\beta$ , de modo que concentraciones mayores a 50 nM de PMA enmascaran la expresión de ARNm IL-1 $\beta$  inducido por el LPS de *P. endodontalis*.

Consecuentemente, se seleccionó la concentración mínima de PMA que indujo la diferenciación de monocitos a macrófagos (10 nM de PMA) y la concentración máxima del LPS de *P. gingivalis* y LPS de *P. endodontalis* (10  $\mu$ g/mL).





**Figura 9. Porcentaje de células doble positivas para marcadores M1 y marcadores M2 y razón M1/M2 en macrófagos *in vitro* estimulados con LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con el LPS de *P. gingivalis* de cepa de referencia (ATCC 33277) o del aislado clínico (AC1Pg) (10  $\mu\text{g/mL}$ ), el LPS *P. endodontalis* de cepa de referencia (ATCC 35406) o del aislado clínico (AC2Pe) (10  $\mu\text{g/mL}$ ), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (LPS Pg + Pe), el LPS de *E. coli* (LPS Ec) (10 ng/mL) por 24 horas. Los macrófagos se tiñeron con anticuerpos anti-CD64, anti-CD80, anti-CD163 y anti-CD206 y se analizaron por citometría de flujo. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de A. Porcentaje de células CD64<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> macrófagos M1, B. CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> macrófagos M2, C. Relación M1/M2. S/T Sin Teñir. Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3) \*p <0,05.

### **VIII.2.3 El LPS de *P. gingivalis*, no así el LPS de *P. endodontalis*, induce una respuesta inflamatoria predominantemente M1 en macrófagos *in vitro***

#### **VIII.2.3.1 Estimulación de macrófagos *in vitro* con LPS de *P. gingivalis* o *P. endodontalis***

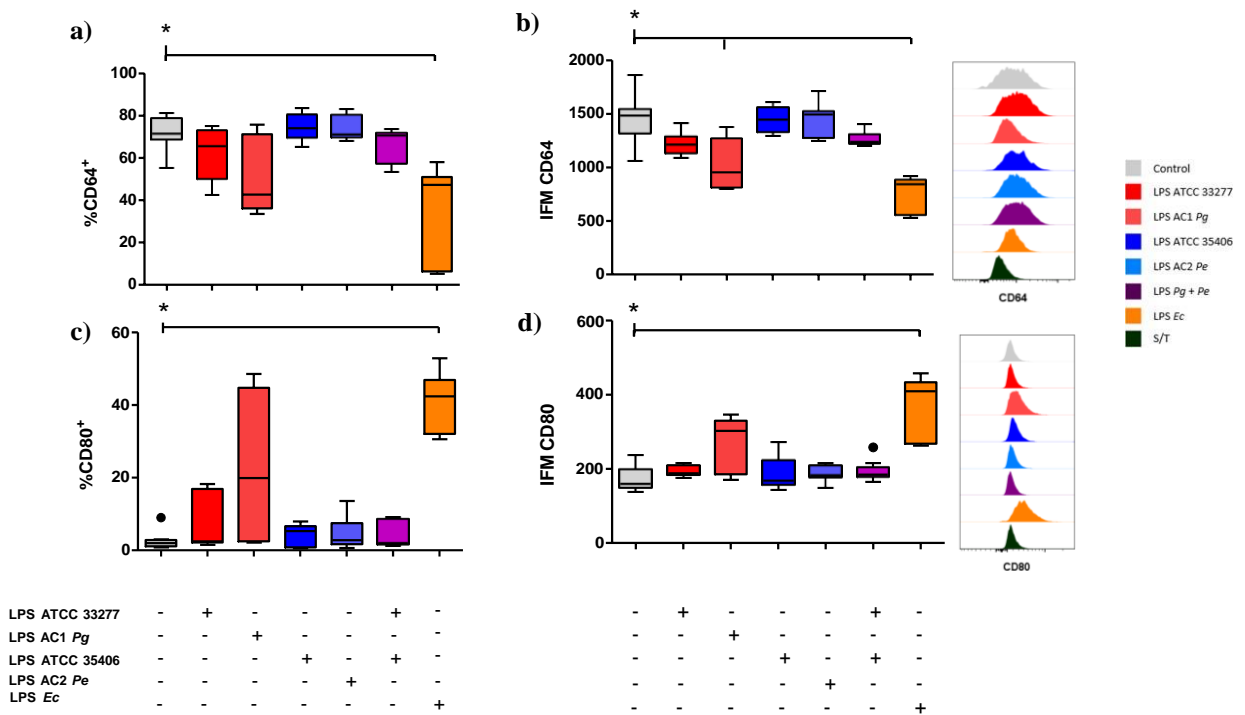
Una vez estandarizadas las variables experimentales, los cultivos de macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 con PMA fueron estimulados por 24 horas con 10 µg/mL de LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277, LPS de *P. gingivalis* AC1Pg, LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406, LPS de *P. endodontalis* AC2Pe, combinación de LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (10 µg/mL de cada uno) (LPS Pg + Pe) o control positivo LPS de *E. coli* (10 ng/mL) en triplicado (n=3).

#### **VIII.2.3.2 El LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis* no induce un perfil fenotípico M1 sobre la base de la doble expresión de marcadores de superficie en macrófagos *in vitro***

Se evaluó el rol del LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* en la polarización de macrófagos, mediante el porcentaje de células doble positivas para marcadores M1 (CD64<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>) o M2 (CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) y la razón de macrófagos M1/M2.

La condición sin estímulo mostró un 1,9% de macrófagos M1 y el control con LPS de *E. coli* indujo un aumento estadísticamente significativo de macrófagos M1 al 28,0% (p<0,05), mientras que el LPS de *P. gingivalis*, específicamente el LPS AC1Pg, mostró una tendencia similar al LPS de *E. coli*, aumentando la población M1 a un 12,7%. Por otro lado, el LPS de *P. endodontalis* (ATCC 35406 y AC2Pe) inoculado solo o como co-estímulo con el LPS *P. gingivalis* no indujo cambios en esta población (Figura 9A). En el caso de la diferenciación a macrófagos M2, no se observaron cambios en ninguna de las condiciones evaluadas (Figura 9B).

En el balance de macrófagos M1/M2, la razón calculada en la condición sin estímulo fue de 0,85. El LPS de *E. coli* indujo un aumento de la razón M1/M2 a 7,7 (p<0,05), mientras que el LPS de *P. gingivalis* (ATCC 33277 y AC1Pg) mostró una tendencia no significativa al aumento en esta razón a 1,5 y 4,7 respectivamente. En cambio, el LPS de *P. endodontalis* (ATCC 35406 y AC2 Pe) y el co-estímulo LPS Pg + Pe no indujeron cambios (Figura 9C)



**Figura 10. Porcentaje de células positivas para marcadores M1 y expresión de marcadores M1 en macrófagos *in vitro* estimulados con el LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con el LPS de *P. gingivalis* de cepa de referencia (ATCC 33277) o del aislado clínico (AC1Pg) (10 µg/mL), el LPS de *P. endodontalis* de cepa de referencia (ATCC 35406) o del aislado clínico (AC2Pe) (10 µg/mL), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (LPS Pg + Pe), el LPS de *E. coli* (LPS Ec) (10 ng/mL) por 24 horas. Los macrófagos se tiñeron con anticuerpos anti-CD64 y anti-CD80 y se analizaron por citometría de flujo. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de A, C. Porcentaje de células CD64<sup>+</sup> o CD80<sup>+</sup> respectivamente y B, D. Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de CD64 o CD80 respectivamente. S/T Sin Teñir. Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3) \*p<0,05.

### VIII.2.3.3 El LPS de *P. gingivalis*, no así el LPS de *P. endodontalis*, disminuye la población de macrófagos CD64<sup>+</sup> y aumenta la CD80<sup>+</sup>

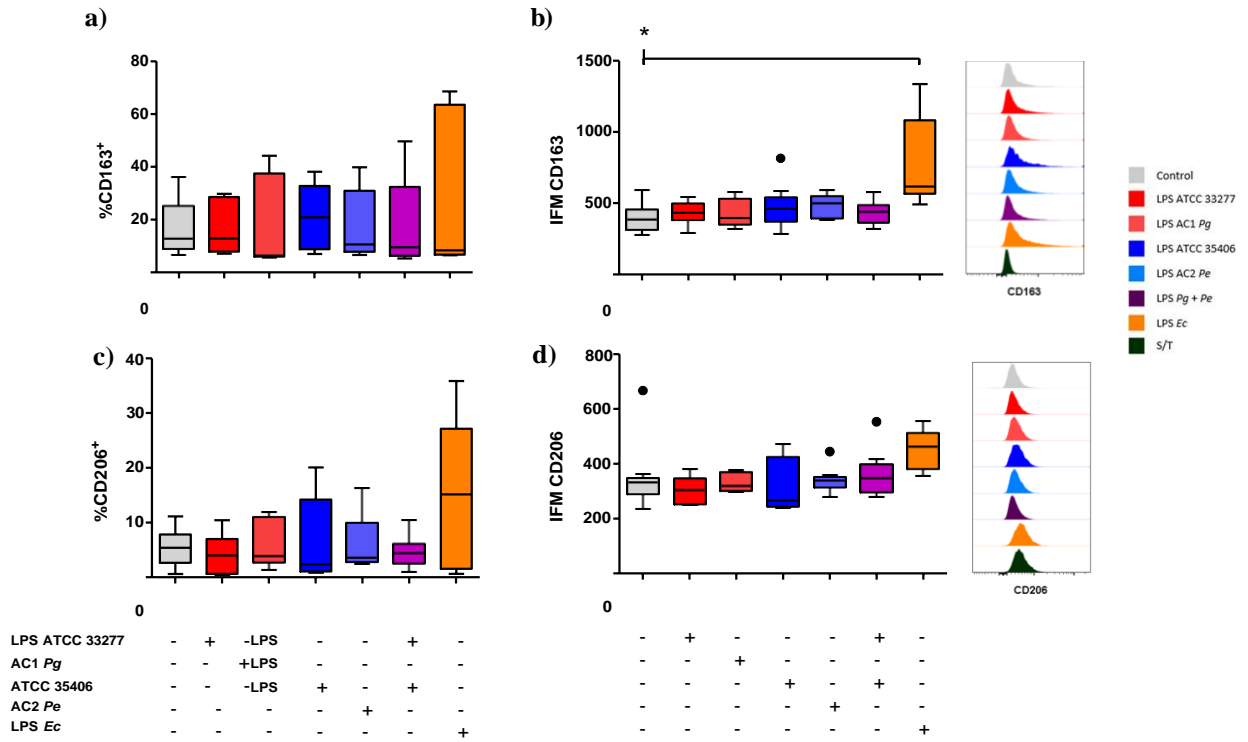
Con el propósito de analizar el efecto de los estímulos con los distintos LPS sobre la polarización de macrófagos hacia el perfil M1 (CD64 y CD80) o M2 (CD163 y CD206), evaluamos las subpoblaciones de macrófagos positivos para marcadores de superficie de M1 (CD64<sup>+</sup> o CD80<sup>+</sup>) y M2 (CD163<sup>+</sup> o CD206<sup>+</sup>) y los niveles de superficie de dichos marcadores por medio de la intensidad de fluorescencia media (IFM).

Se observó que en la condición control sin estímulo, los macrófagos CD64<sup>+</sup> fueron el 71,3% de la población. Los LPS de *P. gingivalis* tendieron a disminuir el número de macrófagos CD64<sup>+</sup>, específicamente el LPS de AC1Pg indujo una tendencia a la disminución del número de macrófagos CD64<sup>+</sup> a un 42,8%, aunque de manera no significativa comparado a la condición control. El LPS de *P. endodontalis* o el co-estímulo no indujeron cambios en el número de macrófagos CD64<sup>+</sup>. El control positivo, LPS de *E. coli*, indujo una disminución de macrófagos CD64<sup>+</sup> al 47,3% ( $p < 0,05$ ) (Figura 10A).

Al medir la IFM de CD64, observamos que el LPS de *P. gingivalis* tendió a inducir una disminución de CD64, específicamente el LPS AC1Pg disminuyó CD64 por debajo del control ( $p < 0,05$ ). El LPS de *P. endodontalis* no indujo cambios en los niveles de CD64. El LPS de *E. coli* disminuyó los niveles del marcador de superficie CD64 de manera significativa comparado a la condición control sin estímulo ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B).

Al evaluar el número de macrófagos CD80<sup>+</sup>, se observó en el control sin estímulo que tan solo 2% eran CD80<sup>+</sup>. El LPS de *P. gingivalis*, *P. endodontalis* o la combinación de ambos no indujo un aumento en la población CD80<sup>+</sup>. Como era de esperar, el LPS de *E. coli* indujo un aumento de macrófagos CD80<sup>+</sup> a un 42,4%, muy por encima a la condición control ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C).

Al estimar la IFM de CD80, el LPS de *P. gingivalis* de ATCC 33277 y de AC1Pg tendieron a aumentar CD80 de manera no significativa comparado tanto al control negativo como al LPS de *E. coli*. Ni el LPS de *P. endodontalis* ni el co-estímulo promovieron aumento de CD80. El LPS de *E. coli* aumentó los niveles de superficie de CD80 sobre el control ( $p < 0,05$ ) (Figura 10D).

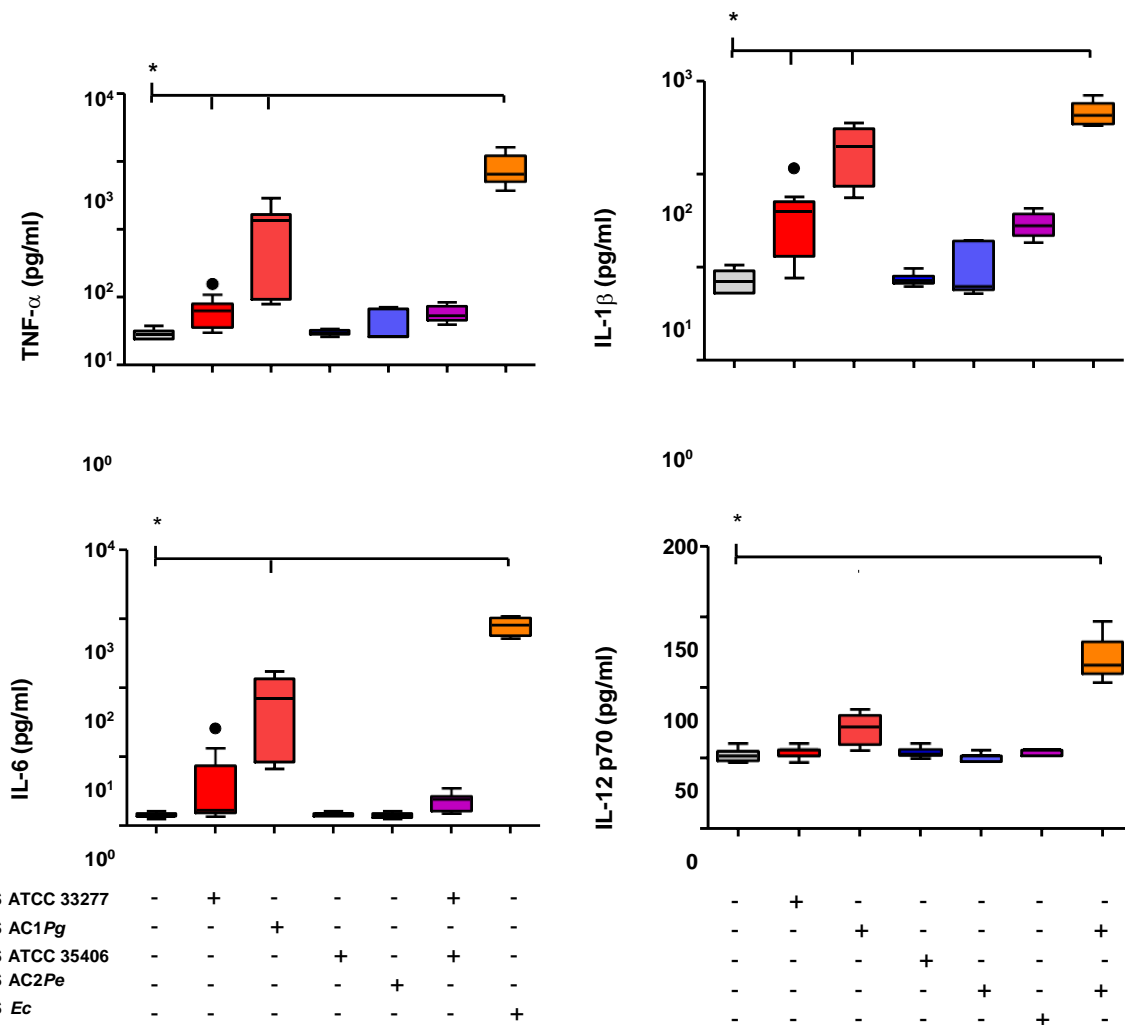


**Figura 11. Porcentaje de células positivas para marcadores M2 expresión de marcadores M2 en macrófagos *in vitro* estimulados con LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con el LPS *P. gingivalis* de cepa de referencia (ATCC 33277) o del aislado clínico (AC1*Pg*) (10 µg/mL), el LPS *P. endodontalis* de cepa de referencia (ATCC 35406) o del aislado clínico (AC2*Pe*) (10 µg/mL), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (LPS *Pg* + *Pe*), el LPS de *E. coli* (LPS *Ec*) (10 ng/mL) por 24 horas. Macrófagos se tiñeron con anticuerpos anti-CD163 y anti-CD206 y se analizaron por citometría de flujo. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de A, C. Porcentaje de células CD163<sup>+</sup> o CD206<sup>+</sup> respectivamente y B, D. Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de CD163 o CD206 respectivamente. S/T sin teñir. Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3) \*p <0,05.

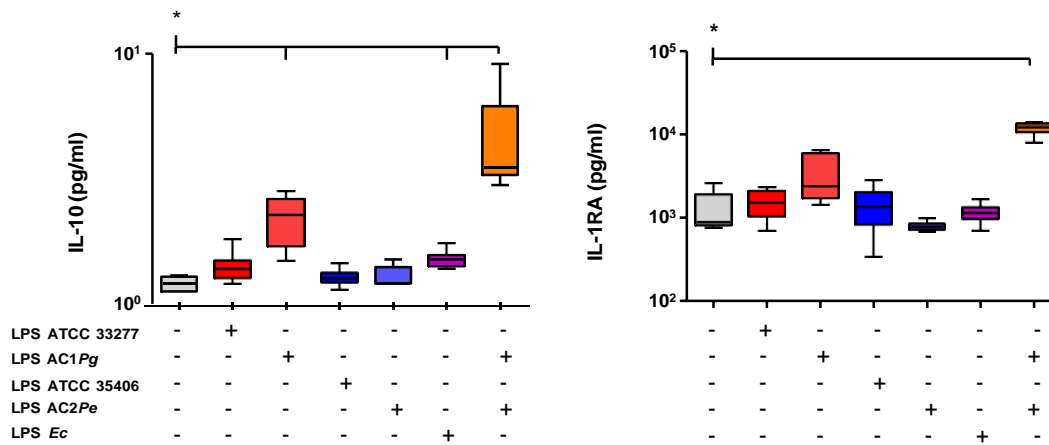
#### **VIII.2.3.4 El LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis* no inducen un perfil fenotípico M2 en macrófagos *in vitro***

Al evaluar las poblaciones positivas para marcadores M2 (CD163<sup>+</sup> o CD206<sup>+</sup>), no observamos cambios estadísticamente significativos en ninguna de las condiciones evaluadas. Al evaluar la IFM de marcadores M2, en el caso del estímulo con el LPS de *P. gingivalis*, LPS de *P. endodontalis* o el co-estímulo con ambos, tampoco observamos cambios en los niveles de expresión de superficie de CD163 o CD206 con respecto al control negativo. Por el contrario, el control positivo, el LPS de *E. coli*, indujo un aumento de los niveles de CD163 de superficie comparado con el control sin estímulo, sin embargo, esto no se observó para el marcador CD206 (Figura 11).

En síntesis, con respecto a los fenotipos de macrófagos definidos sobre la base de la expresión de sus marcadores de superficie, el LPS de *P. gingivalis* (10 µg/mL) - especialmente el de aislado clínico AC1Pg- indujo una diferenciación M1 similar a la inducida por el LPS de *E. coli* (10 ng/mL), aunque más atenuada. Esto, basado en la reducción de CD64, aumento de CD80, y la ausencia de cambios en los niveles de CD163 o CD206, comparados con macrófagos sin estimular. Por otro lado, el LPS de *P. endodontalis* no exhibió variaciones en los niveles de los marcadores medidos.



**Figura 12. Concentración de citoquinas M1 de macrófagos *in vitro* estimulados con LPS *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con el LPS *P. gingivalis* de cepa de referencia (ATCC 33277) o del aislado clínico (AC1Pg) (10 µg/mL), el LPS *P. endodontalis* de cepa de referencia (ATCC 35406) o del aislado clínico (AC2Pe) (10 µg/mL), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (LPS Pg + Pe), el LPS *E. coli* (LPS *Ec*) (10 ng/mL) por 24 horas. Se midieron citoquinas desde el sobrenadante por técnica multiplex. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de A. Concentración de TNF-α B. IL-1β C. IL-6 y D. IL-12, Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3) \*p<0,05 con respecto a control sin estímulo.



**Figura 13. Concentración de citoquinas M2 de macrófagos *in vitro* estimulados con LPS *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con el LPS *P. gingivalis* de cepa de referencia (ATCC 33277) o del aislado clínico (AC1Pg) (10 µg/mL), el LPS de *P. endodontalis* de cepa de referencia (ATCC 35406) o del aislado clínico (AC2Pe) (10 µg/mL), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (LPS Pg + Pe), el LPS *E. coli* (LPS Ec) (10 ng/mL) por 24 horas. Se midieron citoquinas desde el sobrenadante por técnica multiplex. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico de A. Concentración de IL-10 B. IL-1RA. Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3). \*p<0,05 con respecto a control sin estímulo.



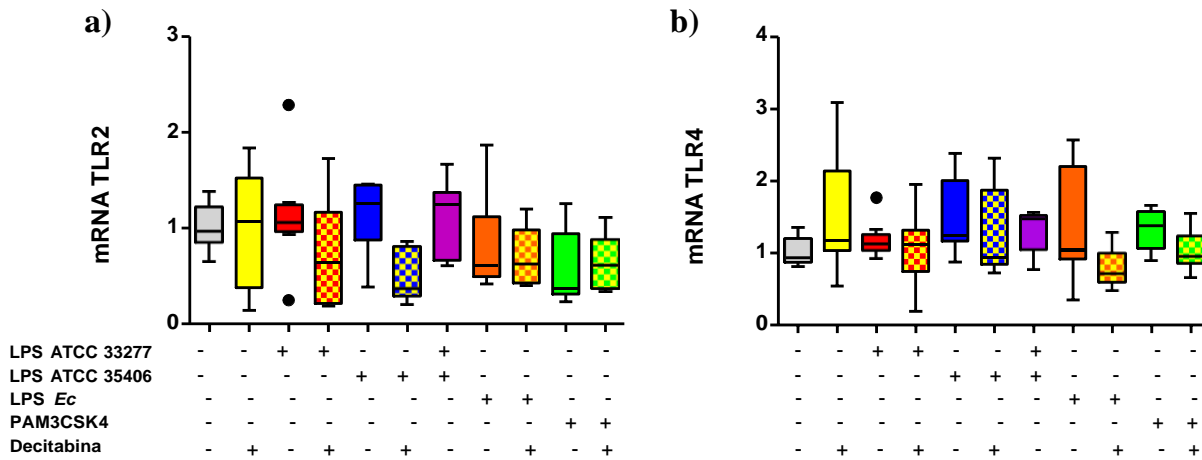
### VIII.2.3.5 El LPS de *P. gingivalis* induce la secreción de citoquinas M1 en macrófagos *in vitro*

Se evaluaron los niveles de citoquinas M1 pro-inflamatorias y M2 anti-inflamatorias desde el sobrenadante de cultivos de macrófagos *in vitro* estimulados con los LPS provenientes de distintas cepas de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*.

Al evaluar las concentraciones de las citoquinas M1 secretadas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12) (Figura 12), observamos que el LPS *P. gingivalis* aumentó los niveles de citoquinas pro-inflamatorias; específicamente, el LPS de ATCC 33277 indujo un aumento significativo de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  comparado con la condición control ( $p < 0,05$ ), y el LPS de *P. gingivalis* AC1Pg, indujo un aumento significativo en las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 comparado con la condición control ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, tanto el LPS de *P. endodontalis*, como el co-estímulo, no indujeron cambios significativos en la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias medidas respecto del control negativo. También, el estímulo con el control positivo, LPS de *E. coli*, aumento la secreción de citoquinas M1 de manera similar, aunque más pronunciada, que la inducida por el LPS de *P. gingivalis* ( $p < 0,05$ ).

En el caso de citoquinas M2 (Figura 13), el estímulo con el LPS de *P. gingivalis* (LPS AC1Pg) indujo un aumento significativo de IL-10 comparado con la condición control sin estímulo ( $p < 0,05$ ), el co-estímulo indujo un aumento significativo de IL-10 aunque menor al LPS de *P. gingivalis* o el control positivo; por otra parte, al estimular con el LPS de *P. endodontalis* no se detectaron cambios en los niveles de citoquinas M2. En tanto que el LPS de *E. coli* aumentó significativamente la secreción de IL-10 e IL-1RA comparado con la condición sin estímulo.

**A partir de la determinación de los perfiles de diferenciación, sobre la base de marcadores de superficie y citoquinas secretadas por macrófagos, se puede concluir que el LPS de *P. gingivalis* (10  $\mu\text{g/mL}$ ) -tanto el proveniente de la cepa de referencia ATCC 33277, como del aislado clínico- inducen una respuesta inflamatoria predominantemente M1, comparable a la del LPS de *E. coli* (10  $\text{ng/mL}$ ), aunque de menor intensidad. Por otro lado, nuestros extractos de LPS de *P. endodontalis* -tanto de la cepa de referencia ATCC 35406, como del aislado clínico AC2Pe- demostraron una baja o nula capacidad de inducir un patrón de diferenciación de macrófagos y secreción de citoquinas pro-inflamatorias.**



**Figura 14. Expresión génica de TLR2 y TLR4 en macrófagos *in vitro* estimulados con el LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* se estimularon con el LPS de *P. gingivalis* cepa de referencia ATCC 33277 (10 µg/mL), el LPS de *P. endodontalis* de cepa de referencia ATCC 35406 (10 µg/mL), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406, el LPS de *E. coli* (LPS *Ec*) (10 ng/mL) o el lipopéptido PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (10 ng/mL) por 2 horas. También, las células fueron tratadas con decitabina (500 nM) o se dejaron descansar por 24 horas previamente al estímulo. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con ARNr 18S y expresado como la diferencia entre 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico, Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3).

### **VIII.3 Determinar *in vitro* los niveles de TLR2 y TLR4 de superficie celular y sus transcritos en macrófagos diferenciados de THP-1 y estimulados con el LPS de *P. endodontalis*, *P. gingivalis* y la combinación de ambos**

#### **VIII.3.1. El LPS de *P. gingivalis* y/o de *P. endodontalis* no inducen cambios en los niveles transcripcionales de TLR2 y TLR4 en macrófagos *in vitro***

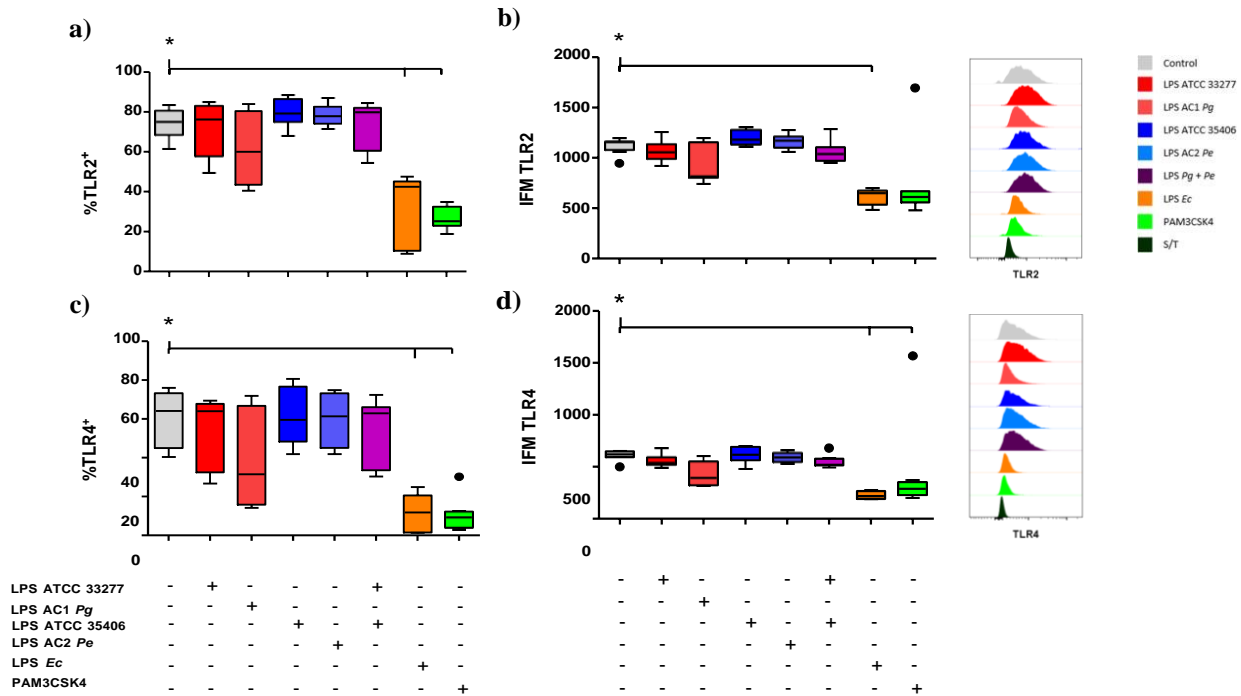
Los niveles relativos de ARNm de TLR2 o TLR4 no mostraron cambios en las células estimuladas con LPS *P. gingivalis* y/o LPS *P. endodontalis* comparadas con el control sin estímulo. Tampoco observamos cambios estadísticamente significativos en los controles positivos estimulados con LPS *E. coli* o PAM3CSK4.

Con respecto a los cultivos celulares tratados previamente decitabina 500 nM; los niveles de ARNm, tanto de TLR2 como de TLR4, tampoco demostraron cambios significativos en los distintos grupos experimentales comparados con el grupo control sin estímulo (Figura 14).

**En base a lo anterior, podemos concluir que, en nuestro modelo experimental, la estimulación con LPS de *P. gingivalis* y/o de *P. endodontalis*, no indujo cambios en los niveles de mRNA de TLR2 o TLR4; mientras que la decitabina, agente desmetilante del ADN, tampoco indujo cambios significativos en los niveles de ARNm de TLR2 o TLR4 comparados con los controles sin estímulo.**

#### **VIII.3.2. El LPS de *P. gingivalis* y/o de *P. endodontalis* no inducen cambio en los niveles de superficie de TLR2 y TLR4 en macrófagos *in vitro***

Se determinó el porcentaje de células TLR2<sup>+</sup> y TLR4<sup>+</sup> y la intensidad de fluorescencia media (IFM) de TLR2 y TLR4 en cultivos de macrófagos estimulados por 24 horas con 10 µg/mL de LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277, LPS de *P. gingivalis* AC1Pg, LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406, LPS de *P. endodontalis* AC2Pe y la combinación de LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 y de *P. endodontalis* ATCC 35406 (10 µg/mL de cada uno) (LPS Pg + Pe) o los controles positivos LPS de *E. coli* (10 ng/mL) o PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (10 ng/mL).



**Figura 15. Porcentaje de células TLR2<sup>+</sup> y TLR4<sup>+</sup> y expresión de TLR2 y TLR4 en macrófagos *in vitro* estimulados con el LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis*.** Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con el LPS de *P. gingivalis* cepa de referencia (ATCC 33277) o del aislado clínico (AC1Pg) (10 µg/mL), el LPS de *P. endodontalis* de cepa de referencia (ATCC 35406) o del aislado clínico (AC2Pe) (10 µg/mL), la combinación del LPS de *P. gingivalis* ATCC 33277 más el LPS de *P. endodontalis* ATCC 35406 (LPS Pg + Pe), el LPS de *E. coli* (LPS Ec) (10 ng/mL) o el lipopéptido PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (10 ng/mL) por 24 horas. Macrófagos se marcaron con anticuerpos anti-TLR2 y anti-TLR4 y se analizaron por citometría de flujo. A y C. Porcentaje de células TLR2<sup>+</sup> o TLR4<sup>+</sup> respectivamente. B y D. Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de TLR2 o TLR4 respectivamente S/T Sin Teñir. Experimentos se realizaron en triplicado. Los datos fueron analizados por el test Kruskal Wallis. (n=3) p <0,05.

Tabla 1. Matriz de correlación de Spearman de niveles de los marcadores de superficie M1 y M2, TLR2, TLR4 y citoquinas secretadas.

|               | CD64    | CD80    | CD163  | CD206   |
|---------------|---------|---------|--------|---------|
| TNF- $\alpha$ | -0,9*** | 0,7***  | 0,3*** | 0,4***  |
| IL-1 $\beta$  | -0,9*** | 0,7***  | 0,3*** | 0,4***  |
| IL-6          | -0,8*** | 0,7***  | 0,4*** | 0,4***  |
| IL-12p70      | -0,7*** | 0,8***  | 0,5*** | 0,4***  |
| IL-10         | -0,8*** | 0,7***  | 0,4*** | 0,4***  |
| IL-1RA        | -0,5*** | 0,6***  | 0,5*** | 0,3**   |
| TLR2          | 0,9***  | -0,6*** | -0,3*  | -0,4*** |
| TLR4          | 0,9***  | -0,6*** | -0,3** | -0,4*** |

Valores corresponden a r (Rho). \*p<0,05; \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,0005.

En el control sin estimular se observó un número basal de macrófagos TLR2<sup>+</sup> y TLR4<sup>+</sup> de 74,9% y 64,0% respectivamente. El estímulo con LPS de *P. gingivalis*, específicamente AC1Pg, indujo una disminución de la población de macrófagos TLR2<sup>+</sup> y TLR4<sup>+</sup>, aunque no significativa en comparación con el control sin estímulo. El LPS de *P. endodontalis* como el co-estímulo tampoco provocaron cambios evidentes en el porcentaje de macrófagos TLR2<sup>+</sup> o TLR4<sup>+</sup>. Por otro lado, los controles positivos, LPS de *E. coli* y PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, redujeron significativamente ambas poblaciones, TLR2<sup>+</sup> y TLR4<sup>+</sup>, por debajo de la condición control sin estímulo (p<0,05) (Figura 15).

Respecto de la IFM, se observó que el LPS de *P. gingivalis* y/o el LPS de *P. endodontalis*, no indujeron cambios significativos sobre los niveles de TLR2 y TLR4. El LPS de *E. coli* indujo una disminución significativa de TLR2 y TLR4; mientras que PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> indujo una disminución significativa de TLR4 en comparación con la condición sin estímulo (p< 0,05) (Figura 15).

Finalmente, analizamos los niveles TLR2 y TLR4 por coeficiente de Spearman y observamos correlación positiva con los niveles de CD64, y una correlación negativa con los marcadores de superficie CD80, CD163 y CD206 y las citoquinas secretadas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e IL-10) (Tabla 1).

**Sobre la base de los resultados podemos concluir que la estimulación por LPS de *P. gingivalis* y/o de *P. endodontalis* en nuestro modelo experimental no induce cambios en los niveles de TLR2 o TLR4 de superficie celular. Ésta última se correlaciona directamente con los niveles de CD64 e inversamente con los niveles de secreción de las citoquinas estudiadas.**

## IX. DISCUSIÓN

La PA es una infección dental prevalente que se manifiesta como una lesión localizada con signos bien definidos de inflamación crónica y reabsorción ósea (Hsiao et al., 2012; Rocas et al., 2011). La variabilidad clínica y la progresión de la ALEO asociado dependería, en mayor parte, a la respuesta inmune inducida por la infección endodóntica (Buonavoglia et al., 2013; Gutmann et al., 2009; Hsiao et al., 2012). Basado en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, actividad de resorción ósea, y lesiones de mayor tamaño (Azuma, 2006; Gazivoda et al., 2009; Marinho et al., 2015; Martinho et al., 2014), se ha propuesto que, en comparación con PAA, PAS serían una forma más progresiva de la enfermedad y que adicionalmente se manifiesta con síntomas clínicos (Menezes et al., 2008; Salinas-Muñoz et al., 2017).

Los macrófagos desempeñan un papel importante en la progresión de enfermedades inflamatorias como la PA, sin embargo, su papel y perfil fenotípico en las diferentes formas de PA aún no han sido del todo estudiadas. En esta tesis, describimos en ALEOs un perfil de polarización de macrófagos predominantemente M1 por sobre M2, basado en fenotipos de macrófagos  $CD64^+CD80^+$  /  $CD163^+CD206^+$ , que también se reflejó en el perfil general de citoquinas pro-inflamatorias. Específicamente, y en comparación con PAA, PAS exhibió un perfil de diferenciación de macrófagos a M2 más tenue, basado en una reducción de los niveles de CD163, junto con la sobreexpresión del ARNm de citoquinas M1, IL-6 e IL-23.

Tal como se describe en los resultados del objetivo específico 1, caracterizamos las subpoblaciones de macrófagos M1 y M2 en ALEOs de PAS y PAA en función de la expresión de sus marcadores de superficie. Dado que los perfiles de macrófagos M1 y M2 *in vivo* representan los extremos de un continuo de células intermedias, los estudios en humanos se han visto obstaculizados por la falta de marcadores fenotípicos validados (Ambarus et al., 2012). Previamente se han validado sistemáticamente los marcadores de superficie CD64 y CD80 para M1, así como CD163 y CD206 para M2, y se ha sugerido su uso en conjunto con un marcador para macrófagos como CD14 (Ambarus et al., 2012; Barros et al., 2013; Ortiz et al., 2015). Nosotros identificamos una tendencia a un mayor porcentaje de células  $CD14^+$  tanto en PAS y PAA en comparación con los controles HPL, lo que apunta a un aumento de la población de macrófagos tisulares en ALEOs como resultado de la infección endodóntica y las resultantes señales de quimio-atrayentes. Anteriormente se ha reportado que los macrófagos de origen embrionario residentes en tejidos adultos están involucrados en la remodelación de tejidos, como ocurre durante la homeostasis del tejido periodontal; mientras que las células derivadas

de monocitos pueden ayudar principalmente en la defensa del hospedero (Epelman et al., 2014). En consecuencia, es probable que el enriquecimiento de macrófagos en las lesiones apicales se pueda explicar por el reclutamiento y la diferenciación de monocitos a partir de sangre periférica.

CD64 es un marcador M1 bien caracterizado que corresponde al receptor tipo I de alta afinidad para la fracción Fc de la IgG (Ravetch and Kinet, 1991) y desencadena respuestas pro-inflamatorias funcionales (Hristodorov et al., 2012), mientras que CD80 es una molécula co-estimuladora de la activación de linfocitos T durante la presentación de antígenos, expresada en macrófagos, células dendríticas y linfocitos B activados. Si se combina con CD14, CD80 también es un marcador M1 útil y específico (Ambarus et al., 2012; Barros et al., 2013). Por otro lado, CD163 y CD206 son marcadores M2 bien caracterizados. CD163 es un receptor “scavenger” o eliminador del complejo hemoglobina-haptoglobina que se expresa exclusivamente en monocitos / macrófagos y CD206 es un receptor de lectina de tipo C, ambos implicados en la capacidad fagocítica de los macrófagos para eliminar desechos y células apoptóticas y, por lo tanto, involucrado en funciones reparadoras (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

El análisis de la frecuencia (mediana) del número de células CD64<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, para macrófagos M1, y células CD163<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>, para macrófagos M2, en PAS, PAA y comparado con HPL control sano reveló una tendencia de ambas subpoblaciones a ser los más altos en PAS, seguido por PAA y por último en HPL, aunque no de manera significativa. En cambio, el balance entre estas subpoblaciones de macrófagos expresado como razón M1/M2 se reveló más alto en PAS, seguido por PAA y por último HPL control sano (0,83, 0,81 y 0,40, respectivamente), mostrando una diferencia significativa entre PAS y HPL control sano ( $p < 0,05$ ), y una diferencia entre PAA y HPL. A pesar de que no existen en la literatura estudios similares, se han reportado previamente estudios basados en técnicas histológicas y enfoques semi-cuantitativos que demostraron un índice más alto de macrófagos M1 sobre M2 en quistes radiculares inflamatorios, seguido de los granulomas apicales, y fueron los más bajos en los quistes dentígeros, los cuales son de naturaleza no inflamatoria. Además, los recuentos de macrófagos fueron más bajos en las últimas lesiones (Weber et al., 2017). De manera similar, se informó mediante inmunofluorescencia, una población de macrófagos M1 y una relación M1 / M2 más altas en el tejido gingival de pacientes con periodontitis marginal comparado a pacientes con gingivitis e individuos sanos (Zhou et al., 2018). Curiosamente, el grupo de gingivitis mostró un aumento del fenotipo M2 y niveles de IL-6 funcionalmente más bajos en



comparación con los tejidos sanos y con periodontitis (Zhou et al., 2018). Nuestros hallazgos destacan aún más el papel de la plasticidad de los macrófagos y la dinámica de diferenciación en ALEOs, mostrando un equilibrio fenotípico hacia M1 sobre M2. Componentes bacterianos, como el LPS de bacterias Gram negativo, difunden a los tejidos perirradiculares induciendo inflamación apical. Además, se han identificado ADN de bacterias endodónticas con frecuencia en ALEOs, lo que apoya la idea de la translocación bacteriana desde el canal radicular hacia estructuras más allá del diente (Wang et al., 2012). Durante la PA, los patobiontes endodónticos y sus factores de virulencia inducirían un cambio en el fenotipo de los macrófagos hacia un perfil funcional M1 al unirse con TLR, demostrando una mayor presentación de antígenos y capacidades de destrucción microbiana, modificando sus perfiles transcripcionales asociados a la producción de citoquinas y quimioquinas, metabolismo del NO y fagocitosis (Derlindati et al., 2015). Un desequilibrio más llamativo hacia la polarización M1 sobre M2 podría mediar el inicio de PAS a partir de PAA previamente existente. De hecho, PAA podría representar una etapa caracterizada por un equilibrio entre las funciones de eliminación de patógenos y la modulación inmunológica y reparación (Derlindati et al., 2015; Mills, 2015; Ortiz et al., 2015).

El análisis de la frecuencia (mediana) del número de células positivas para solo uno de los marcadores M1 o M2 sugieren una tendencia similar a la observada para los macrófagos doble positivos, que indican un aumento progresivo que va desde HPL controles sanos a PAA y PAS, a excepción del caso de células CD163<sup>+</sup>, las que permanecieron altas y cercanas al 100% en las tres condiciones estudiadas. Por otro lado, nuestros resultados demostraron diferencias en los niveles de superficie de CD163 en células CD14<sup>+</sup>, observándose que los niveles de IFM de CD163 fueron los más altos en HPL controles sanos y se redujo progresiva y significativamente en PAA y llegando a ser los más bajos en PAS. Con respecto a lo anterior, se han detectado macrófagos que expresan CD163 en sitios de inflamación como articulaciones con artritis crónicamente inflamadas, placas ateroscleróticas y la vecindad de células tumorales (macrófagos asociados a tumores) (Etzerodt and Moestrup, 2013). En conjunto, estos hallazgos sugieren que durante la infección endodóntica, los macrófagos de la lesión apical podrían expresar el fenotipo de superficie CD64<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, mientras que la transición de PAA a PAS se asociaría con una mayor desviación hacia M1 evidenciado en la caída en la densidad de marcadores de superficie M2, especialmente de CD163. Durante la fase sintomática de la PA, la exposición de macrófagos M2 a señales M1, como lo podría ser citoquinas provenientes de Th1 o también una mayor concentración de LPS, podría reprogramarlos hacia un fenotipo más M1, en conjunto con una disminución de las funciones “scavenger” propias de macrófagos M2.

CD163 es un marcador específico de monocitos/macrófagos antiinflamatorios, que se regula positivamente durante la diferenciación de macrófagos dependiente del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) de los monocitos sanguíneos humanos (Buechler et al., 2000). En los macrófagos tisulares, CD163 transduce señales tras la unión de sus ligandos que conducen a la liberación de mediadores antiinflamatorios, como IL-10 e IL-1RA, y a la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias. De hecho, moléculas pro-inflamatorias exógenas, como LPS, pueden disminuir la expresión de CD163 en PAS y, a la inversa, los niveles de CD163 en macrófagos tisulares aumentan durante la resolución de la respuesta inflamatoria aguda o durante la fase de cicatrización de heridas, como podría ocurrir durante la PAA (Alvarado-Vazquez et al., 2017). Estos hallazgos respaldan aún más la idea de que PAS se asociaría con una respuesta inmune exacerbada.

Funcionalmente, los macrófagos pueden iniciar y modular las respuestas de los linfocitos T, controlar la homeostasis local del tejido e interactuar con las células madre (Weber et al., 2017). A la vez que hallamos un perfil de polarización de macrófagos predominante M1, también encontramos un aumento significativo de ARNm de citoquinas distintivas de M1, específicamente IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$  en PAS y PAA por sobre controles sanos. Sorprendentemente, IL-6 fue regulada positivamente en PAS, seguido por PAA y HPL controles sanos respectivamente, hallando así diferencias significativas entre las tres condiciones, mientras que IL-23 fue más alta en PAS versus PAA y HPL. Los niveles de expresión de IL-10 mostraron un comportamiento similar al de la mayoría de las citoquinas M1, pero TGF- $\beta$  fue significativamente menor en PAS por sobre HPL. Los resultados de perfiles de citoquinas pro-inflamatorias más altas y citoquinas anti-inflamatorias más bajas, confirman que los macrófagos en ALEOs se inclinan funcionalmente hacia un fenotipo predominante M1 sobre M2, especialmente en PAS sobre PAA y HPL.

La PAS se ha caracterizado previamente por una expresión elevada de MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13 sobre PAA (Fernández et al., 2019) y una actividad de reabsorción ósea elevada en comparación con PAA y controles basado en los niveles de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) (Salinas-Muñoz et al., 2017). La perpetuación de la inflamación por macrófagos conduce al reclutamiento de la respuesta inmune adaptativa. La activación de los macrófagos M1 da como resultado la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y fomento de los patrones Th1 y Th17 de las respuestas inmunes (Shapouri-Moghaddam et al., 2018), que están directamente asociadas con la degradación periodontal (Hernández et al., 2011). Específicamente, los incrementos de IL-23 e IL-6 están involucrados en la diferenciación Th17

y la osteoclastogénesis, al producir Ligando de Receptor Activador para el factor Nuclear Factor Nuclear kappa-B (RANKL), en asociación con el inicio y progresión de la periodontitis (Duvallet et al., 2011; Ma et al., 2017). Por el contrario, los macrófagos M2 inducen respuestas Th2 y Tregs (Shapouri-Moghaddam et al., 2018) y son protectores periodontalmente. De acuerdo con esto, la inducción del fenotipo del macrófago M2 reduce la pérdida de hueso alveolar en el modelo de periodontitis experimental (Zhuang et al., 2019).

La IL-6 también es una citoquina clave en el diálogo cruzado entre las respuestas inflamatorias locales y sistémicas al inducir en el hígado y las células mononucleares la síntesis de proteína C reactiva (PCR). De hecho, nuestro grupo recientemente demostró también la síntesis de PCR en tejidos periodontales sanos y lesiones apicales (Garrido et al., 2015; Hernández-Caldera et al., 2017), lo que podría contribuir a explicar su asociación de periodontitis apical, inflamación sistémica y el riesgo cardiovascular (Garrido et al., 2015; Liljestrang et al., 2016; Pasqualini et al., 2012; Petersen et al., 2014). En línea con lo anterior, se ha informado que en un modelo experimental murino de periodontitis marginal existe un aumento de los marcadores fenotípicos de macrófagos M1 a M2 y sus respectivos perfiles de citoquinas en tejido gingival en conjunto con una mayor inflamación sistémica, esto último basado en un aumento de IL-6 a IL-10 en suero comparado con controles sanos (Yu et al., 2016). Estos resultados sugieren una que el perfil de macrófagos M1 predominante en ALEOs podría estar asociado con PAS, reabsorción ósea alveolar exacerbada y también en una mayor propensión a la inflamación sistémica y a enfermedades no transmisibles.

Una fortaleza del diseño de investigación fue la inclusión de un panel de marcadores de superficie para M1 y M2 junto con un marcador de macrófagos (Ambarus et al., 2012; Barros et al., 2013; Ortiz et al., 2015). Un inconveniente metodológico, como se describió anteriormente, fue la diferencia de edad significativa entre los individuos sanos y los pacientes con ALEOs, que es inherente debido a la inclusión de HPL como controles, aunque no se encontraron diferencias entre PAA y PAS (Cavalla et al., 2013; Salinas-Muñoz et al., 2017). También se ha descrito que el tabaquismo influye en la progresión de la periodontitis marginal (Nociti et al., 2015), aunque no hay evidencia que apoye esto en periodontitis apical (Bergstrom et al., 2004), el hábito de fumar se distribuyó uniformemente entre los grupos de estudio, así como otros factores demográficos. Por último, se analizó un número menor de muestras HPL control debido a limitaciones metodológicas, principalmente debido al bajo número de células obtenibles y ARNm a partir de HPL; aun así, HPL mostró una variabilidad considerablemente

menor al resto de las condiciones evaluadas y proporcionaron suficiente poder estadístico para detectar diferencias significativas.

Las bacterias pigmentadas de negro como *P. gingivalis* y *P. endodontalis* serían agentes centrales en la etiopatogenia y progresión de la PA, promoviendo respuestas pro-inflamatorias y osteolíticas debido a sus diversos factores de virulencia (Belstrom et al., 2014; Colombo et al., 2012; Mirucki et al., 2014; Montagner et al., 2012; Perez-Chaparro et al., 2014; Seol et al., 2006). El LPS es un componente distintivo de la membrana celular de bacterias Gram negativo y un potente inductor de secreción de citoquinas. En el caso particular del LPS de *P. gingivalis*, se han identificado una heterogeneidad de estructuras de lípido A de su LPS, lo que le otorgaría la capacidad de inducir una respuesta inmunológica por ligación de TLR2 y TLR4 (Reife et al., 2006). Sin embargo, la respuesta inmune gatillada por los LPS de *P. gingivalis* y particularmente de *P. endodontalis* no han sido aún caracterizadas.

En el presente trabajo purificamos LPS de *P. gingivalis* y LPS de *P. endodontalis* desde dos cepas de referencia (ATCC) y dos aislados clínicos obtenidos de pacientes con PAA con el propósito de investigar la respuesta inmune inducida por los LPS de *P. gingivalis* y de *P. endodontalis* en macrófagos. Lo anterior se realizó utilizando el protocolo de extracción descrito por Yi y Hackett, el cual es rápido, conveniente y de baja escala que utiliza como principal reactivo TRIzol (Yi and Hackett, 2000). Durante el proceso de purificación, descubrimos trazas de proteínas y ácidos nucleicos en nuestros extractos de LPS. Debido a esto, como paso previo, incorporamos tratamientos con las enzimas ADNasa, ARNasa y proteinasa K al pellet bacteriano (Al-Agha., 2017). La incorporación de estos pasos permitió eliminar los contaminantes a excepción de una traza de ADN/ARN observable como una banda electroforética menor a 100 pares de bases en gel agarosa teñido con GelRed previamente no descritos (datos no mostrados). El ADN de origen bacteriano, posee el potencial de estimular TLR9 y desencadenar una respuesta mediada por MyD88 similar a la inducida por TLR2. Con el propósito de purificar nuestros LPS de trazas de ácidos nucleicos añadimos la ruptura mecánica de las bacterias por medio de sonicación del pellet bacteriano previamente a la degradación enzimática (Rezania et al., 2011). Con estas modificaciones al protocolo Yi y Hackett obtuvimos LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* purificados, libre de trazas de proteínas y ácidos nucleicos. Con la incorporación de más pasos al proceso de extracción, observamos una disminución en el rendimiento del protocolo, fluctuando entre 50-90% de LPS peso seco comparado a lo obtenido originalmente. A pesar de esto último, se confirmó la presencia de actividad endotóxica, la que fue mayor a 85 EU/mL, muy por encima a la

reportados en LPS de *P. gingivalis* de origen comercial (~2 EU/mL) (Nativel et al., 2017) como también se detectó KDO, componente estructural del “core” del LPS, en los purificados de LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*. El LPS de *P. gingivalis* obtenido presentó un perfil electroforético característico de la especie, exhibiendo una región de lípido A-core no sustituido, claramente definida en el gel y un largo preferencial de más de 8 unidades repetidas de OAg, de entre 43 y 100 KDa, característico de la especie y consistente con lo descrito previamente en la literatura en diferentes cepas de *P. gingivalis* (Diaz et al., 2015; Paramonov et al., 2005; Rangarajan et al., 2008; Shapira et al., 1998). Por otro lado, el LPS de *P. endodontalis*, a diferencia del LPS de *P. gingivalis*, presentó una región de lípido A-core no sustituido por OAg más tenue comparado con el LPS de *P. gingivalis* y un largo preferente de 8 a 14 unidades repetidas de OAg.

Previamente, se reportó el perfil electroforético de LPS de *P. endodontalis* en geles de Tris-Glicina y su largo preferencial fue menor al del LPS de *E. coli* (Park CJ et al., 2002). De igual manera, en este estudio reportamos en geles de Tris-Tricina que el LPS de *P. endodontalis* posee un largo preferencial menor que el LPS de *E. coli*. Sin embargo, los perfiles electroforéticos obtenidos por nosotros presentan diferencias respecto a los descritos por el grupo de Park. Esto se debería a que el gel de Tris-Glicina otorga mayor resolución de las bandas de menor movilidad electroforética, localizadas región superior del gel (bandas de mayor masa molecular), mientras que el gel de Tris-Tricina otorga mayor resolución a las bandas de mayor movilidad electroforética, localizadas en la región inferior del gel (bandas de menor masa molecular) (Marolda et al., 2006). No obstante estas diferencias metodológicas, los perfiles electroforéticos de nuestros LPS de *P. endodontalis*, como los previamente reportados por Park et al., presentan un largo de cadena preferencial mayor a 8 unidades repetidas de OAg.

Se ha reportado previamente que el LPS de *P. gingivalis* induce la secreción de citoquinas M1 en macrófagos de médula ósea de ratón previamente polarizados a M1 o M2 (Holden et al., 2014), como también, la secreción de citoquinas M1 en macrófagos diferenciados de THP-1 con PMA y polarizados con IFN- $\gamma$  o IL-4 y estimulados simultáneamente con el LPS de *P. gingivalis* (Belfield et al., 2017). Sin embargo, y pese a lo anterior, aún no han sido reportados perfiles de polarización en macrófagos por estimulación de con el LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis* a través de sus marcadores de superficie.

Al evaluar la polarización inducida en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA 10 nM y estimulados con el LPS de *P. gingivalis* y/o *P. endodontalis* o LPS de *E. coli* como control

positivo por 24 horas, observamos por citometría de flujo que el LPS *E. coli* indujo una mayor población M1 doble positivas (CD64<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>) y una mayor razón M1/M2 por sobre la condición control sin estímulo. También, el LPS *E. coli* indujo una reducción de células CD64<sup>+</sup> y aumento de CD80<sup>+</sup>, en conjunto con una disminución del marcador de superficie CD64 y un aumento de CD80. Por último, al medir la secreción de citoquinas evaluadas, el LPS de *E. coli* indujo aumento de secreción de citoquinas M1 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 y de citoquinas M2 IL-10 e IL-1RA.

Nuestro control positivo, LPS de *E. coli*, indujo un fenotipo de macrófagos M1 con menor expresión del marcador de superficie CD64 y mayor expresión del marcador de superficie CD80 en macrófagos diferenciados de THP-1. CD64 es un receptor Fc- $\gamma$  de IgG que se expresa de manera constitutiva en monocitos y macrófagos que desempeña un papel en la citotoxicidad celular que desencadena fagocitosis, secreción de citoquinas pro-inflamatorias, producción de ROS y presentación de antígenos a linfocitos T, por lo que una disminución de CD64 podría apuntar a una disminución de su capacidad fagocítica de los macrófagos (Dugast et al., 2011; Hogarth and Pietersz, 2012; Hulett and Hogarth, 1998). CD80 se expresa en bajos niveles basales y, en conjunto con CD86, son moléculas co-estimuladoras que, sumada la señal MHC unida a antígeno, inducen activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T (Bugeon et al., 2001; Carreno and Collins, 2002). En base de lo anterior, podríamos proponer que en nuestros macrófagos estimulados con LPS podríamos observar una disminución de la capacidad fagocítica acompañada de una mayor capacidad de activar, proliferar y diferenciar linfocitos T.

Al evaluar el papel del LPS de *P. gingivalis* en la polarización de macrófagos diferenciados de THP-1, éste indujo un efecto similar al ya descrito por el LPS de *E. coli*, pero de menor intensidad. Específicamente el aislado clínico indujo disminución de CD64 y aumento de secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12; mientras que la cepa ATCC 33277 indujo aumento de secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Lo anterior se debería a que el LPS de *P. gingivalis* sería inmunológicamente menos activo que el LPS de *E. coli* (Coats et al., 2003; Herath et al., 2013; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2008), lo que se podría atribuir a la heterogeneidad del lípido A del LPS de *P. gingivalis*. LPS de *P. gingivalis* expresa dos variedades de lípido A, una penta-acilada, capaz de activar TLR4 de manera similar al LPS de *E. coli*, y una variedad tetra-acilada que antagoniza TLR4 uniéndose a él, pero que no desencadena una respuesta cascada abajo (Coats et al., 2005; Coats et al., 2003; Hajishengallis et al., 2011; Reife et al., 2006).

Al comparar las diferentes fuentes de LPS de *P. gingivalis*, el LPS de AC1Pg induce una respuesta más potente que la inducida por LPS de ATCC 33277. Se ha descrito en la literatura que aislados clínicos con bajos pasajes de *P. gingivalis* son más virulentos que las cepas de referencia (Lamont et al., 1995), debido a que *P. gingivalis* pierde gradualmente propiedades necesarias para sobrevivir *in vivo* para adaptarse a las condiciones ofrecidas por el cultivo *in vitro* (Kiyama-Kishikawa et al., 2005). Por lo tanto, debido a que el LPS AC1Pg proviene de un aislado clínico de *P. gingivalis* purificado del canal radicular de un paciente con PAA, podemos atribuir lo anterior a una mayor virulencia del LPS de AC1Pg por sobre el LPS de ATCC 33277.

Al evaluar la respuesta inmune gatillada por el LPS *P. endodontalis*, observamos que éste no induce cambios en la expresión de marcadores de superficie M1 o M2 ni en la secreción de citoquinas evaluadas. Sería plausible que LPS de *P. endodontalis* podría poseer una heterogeneidad de lípido A similar a la encontrada en LPS de *P. gingivalis*, pero capaz de inducir una respuesta inmune aún menor; tampoco se puede descartar que las diferencias en la región del OAg del LPS de *P. endodontalis* con respecto a la de *P. gingivalis* pueda jugar un papel en la baja respuesta inmune inducida en nuestro modelo (Diaz et al., 2015; Ortega et al., 2005; Paterson et al., 2009). Debido a que las ALEOs son causadas por una infección polimicrobiana del sistema de canales radiculares del diente, también estudiamos la respuesta inmune de macrófagos co-estimulados con LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*. Para nuestra sorpresa, la co-estimulación no resultó en una mayor respuesta inmune. Lo anterior sugiere que el LPS de *P. endodontalis* podría atenuar la respuesta inmune inducida por el LPS de *P. gingivalis*, al competir y bloquear TLR4 y/o TLR2; sin embargo, si el LPS de *P. endodontalis* efectivamente posee la capacidad de atenuar la respuesta inmune inducida por el LPS de *P. gingivalis* u otras bacterias Gram negativo es algo que necesita seguir siendo investigando.

Al analizar los niveles TLR2 y TLR4 en la superficie de membrana de macrófagos diferenciados de THP-1 estimulados por 24 horas con nuestros LPS y LPS de *E. coli* o PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> como controles positivos, sorprendentemente, ambos controles positivos indujeron una reducción de la población de macrófagos TLR2<sup>+</sup> y TLR4<sup>+</sup> además de una disminución de los niveles de superficie de TLR2 y TLR4. Estos resultados son difíciles de interpretar; si bien se han descrito aumentos de TLR2 y TLR4 ante el estímulo con sus respectivos ligandos, en otros estudios se ha reportado una disminución. Específicamente, se ha observado un aumento de expresión de superficie TLR2 y TLR4, observado por citometría de flujo (MFI) en células THP-1 diferenciadas por 72 horas con 17 nM PMA y estimuladas con LPS de *P. gingivalis* o

LPS de *E. coli* 1 µg/mL por 24 horas (Martin et al., 2001); de modo similar, en monocitos THP-1, LPS *P. gingivalis* o LPS *E. coli* 1 µg/mL por 24 horas indujeron un aumento de células TLR2<sup>+</sup> o TLR4<sup>+</sup>, respectivamente (Sun et al., 2014). Por otro lado, se ha descrito una disminución de la expresión de superficie (MFI), tanto de TLR2 como TLR4, no así de ARNm de TLR2 como de TLR4, tras 24 horas de estímulo con LPS de *P. gingivalis* (1 µg/mL), PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (1 µg/mL) o LPS de *E. coli* (0,1 µg/mL) en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos por medio de citometría de flujo (Andrukhov et al., 2014). Lo anterior sugiere que la expresión proteica de TLR2 y TLR4 podría depender de la concentración de LPS, el modelo celular, y las condiciones de diferenciación a macrófagos (concentración de PMA y tiempos de diferenciación). Adicionalmente, la reducción de CD64 se correlacionó directamente con TLR2 y TLR4. Al respecto, se ha descrito una expresión directamente proporcional entre CD64, TLR2 y TLR4 en monocitos diferenciados a macrófagos provenientes de sangre periférica (Krutzik et al., 2005) y en neutrófilos provenientes de pacientes tuberculosos (Hilda et al., 2018), pero no en macrófagos *in vitro* diferenciados a un perfil pro-inflamatorio. Este antecedente sugiere que podría haber una relación funcional entre ambos, que contribuiría a explicar la reducción de TLR observada en superficie de macrófagos estimulados con LPS en nuestro modelo experimental.

El LPS de *E. coli* al interactuar con TLR4, forma el complejo hexamérico (TLR4/MD-2/LPS)<sub>2</sub> que activa una señalización cascada abajo que culmina con la activación de factores transcripcionales; para ello, y como punto de control, el complejo se internaliza por endocitosis (Kagan et al., 2008; Rosadini and Kagan, 2017; Yamamoto et al., 2003a; Yamamoto et al., 2003b). Se evidenció que macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) internalizan TLR4 tras 30 minutos de ser estimulados con LPS de *E. coli* (Schappe and Desai, 2018). En macrófagos diferenciados de THP-1, estimulados con LPS de *P. gingivalis* o *P. endodontalis*, o tratados con decitabina que es un agente desmetilante, no observamos cambios en la expresión génica de TLR2 o TLR4. Estos resultados sugieren que, en nuestro modelo, la metilación del ADN no desempeñaría un papel preponderante en la reducción de superficie de TLR2 o TLR4. Por otra parte, se ha reportado en células THP-1 que PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> induce tanto aumento de TLR2 *de novo*, como un aumento de sTLR2 (TLR2 soluble), el cual estaría mediado por actividad metaloproteínasa y consecuente proteólisis de TLR2 de la superficie de membrana (Langjahr et al., 2014). Este proceso también podría ser estimulado por PMA y/o LPS (Gebbia et al., 2004; Langjahr et al., 2014; Roomi et al., 2010). En conjunto, estos antecedentes sugieren que la reducción de los niveles de superficie de TLR2 como de TLR4 frente a LPS *E. coli* y



PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> se podrían explicar, al menos en parte, por mecanismos no-transcripcionales; tales como reciclaje, una menor exportación a su superficie o proteólisis de estos receptores.

## X. CONCLUSION

En síntesis, a partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, podemos concluir que:

1) Los macrófagos polarizan predominantemente hacia un perfil M1 en lesiones apicales sintomáticas, en comparación con lesiones apicales asintomáticas y ligamento periodontal sano (Veloso et al., 2020).

2) El LPS de *P. gingivalis* induce una polarización predominantemente hacia M1, pero menos evidente que la inducida por LPS de *E. coli*. Por otro lado, el LPS de *P. endodontalis* no indujo una respuesta inmune evidente.

3) Los LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* no indujeron cambios en los niveles de expresión génica ni de superficie de TLR2 y TLR4 en macrófagos *in vitro*.

En conjunto, la periodontitis apical sintomática se asocia con una respuesta pro-inflamatoria con predominio del perfil M1 de macrófagos. Este perfil estaría en parte determinado por la respuesta inmune inducida lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* en macrófagos.

## **XI. OBSERVACIONES DE EVALUADORES Y SU INCORPORACIÓN**

Punto N°1 Se le solicitó al estudiante complementar el objetivo 2, específicamente la caracterización del LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* para que se observe un perfil electroforético más definido y de acuerdo a lo reportado en la literatura. Se pueden utilizar geles de experimentos anteriores. Además, se solicita incluir controles con lisados bacterianos y complementar la discusión en base a estos resultados.

Realizado. Para completar el objetivo 2, se realizó un gel cargado con los purificados de LPS de *P. gingivalis* y *P. endodontalis* además de otro gel con los lisados bacterianos de *P. gingivalis* y *P. endodontalis*, como control también se cargó LPS de *E. coli* de origen comercial. Se pudo observar que los perfiles electroforéticos del LPS de *P. endodontalis* son acordes a lo reportado a la literatura. Además, se incorporó la determinación de la actividad endotóxica de los LPS purificados.

Punto N°2 Por otra parte se solicita modificar el objetivo 3, eliminando lo que tiene relación con metilación del promotor de TLR2 e incorporando la regulación de este receptor. Se requiere discutir el efecto observado con los controles positivos.

Realizado. Se cambió el objetivo específico 3 además de incorporar la discusión de los controles positivos.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Agha., A.G.M. (2017). Extraction and Purification of Lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *IntJCurrMicrobiolAppSci* 6, 90-100.
- Alvarado-Vazquez, P.A., Bernal, L., Paige, C.A., Grosick, R.L., Moracho Vilrriales, C., Ferreira, D.W., Ulecia-Moron, C., and Romero-Sandoval, E.A. (2017). Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology* 222, 900-912.
- Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R., Reedquist, K.A., Tak, P.P., and Baeten, D.L. (2012). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 375, 196-206.
- Andrukhov, O., Ertlschweiger, S., Moritz, A., Bantleon, H.P., and Rausch-Fan, X. (2014). Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontol Scand* 72, 337-345.
- Azuma, M. (2006). Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res* 41, 361-373.
- Barros, M.H., Hauck, F., Dreyer, J.H., Kempkes, B., and Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One* 8, e80908.
- Beklen, A., Hukkanen, M., Richardson, R., and Konttinen, Y.T. (2008). Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 23, 425-431.
- Belfield, L.A., Bennett, J.H., Abate, W., and Jackson, S.K. (2017). Exposure to *Porphyromonas gingivalis* LPS during macrophage polarisation leads to diminished inflammatory cytokine production. *Arch Oral Biol* 81, 41-47.
- Belstrom, D., Fiehn, N.E., Nielsen, C.H., Kirkby, N., Twetman, S., Klepac-Ceraj, V., Paster, B.J., and Holmstrup, P. (2014). Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *J Clin Periodontol* 41, 104-112.
- Benakanakere, M., Abdolhosseini, M., Hosur, K., Finoti, L.S., and Kinane, D.F. (2015). TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis. *J Dent Res* 94, 183-191.
- Bergstrom, J., Babcan, J., and Eliasson, S. (2004). Tobacco smoking and dental periapical condition. *Eur J Oral Sci* 112, 115-120.
- Bravo, D., Silva, C., Carter, J.A., Hoare, A., Alvarez, S.A., Blondel, C.J., Zaldivar, M., Valvano, M.A., and Contreras, I. (2008). Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J Med Microbiol* 57, 938-946.
- Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67, 97-103.
- Bugeon, L., Hargreaves, R.E., Crompton, T., Outram, S., Rahemtulla, A., Porter, A.C., and Dallman, M.J. (2001). Selective silencing of full-length CD80 but not IgV-CD80 leads to impaired clonal deletion of self-reactive T cells and altered regulation of immune responses. *Eur J Immunol* 31, 118-127.
- Buonavoglia, A., Latronico, F., Pirani, C., Greco, M.F., Corrente, M., and Prati, C. (2013). Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology* 101, 84-88.
- Carreno, B.M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53.
- Cavalla, F., Reyes, M., Vernal, R., Alvarez, C., Paredes, R., Garcia-Sesnich, J., Infante, M., Farina, V., Barron, I., and Hernandez, M. (2013). High levels of CXC ligand 12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration. *J Endod* 39, 1234-1239.
- Coats, S.R., Pham, T.T., Bainbridge, B.W., Reife, R.A., and Darveau, R.P. (2005). MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. *J Immunol* 175, 4490-4498.
- Coats, S.R., Reife, R.A., Bainbridge, B.W., Pham, T.T., and Darveau, R.P. (2003). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun* 71, 6799-6807.
- Colombo, A.P., Bennet, S., Cotton, S.L., Goodson, J.M., Kent, R., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., Dewhirst, F.E., *et al.* (2012). Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 83, 1279-1287.
- Derlindati, E., Dei Cas, A., Montanini, B., Spigoni, V., Curella, V., Aldigeri, R., Ardigo, D., Zavaroni, I., and Bonadonna, R.C. (2015). Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? *PLoS One* 10, e0119751.

Desai, S.V., Love, R.M., Rich, A.M., and Seymour, G.J. (2011). Toll-like receptor 2 expression in refractory periapical lesions. *Int Endod J* 44, 907-916.

Dezerega, A., Madrid, S., Mundi, V., Valenzuela, M.A., Garrido, M., Paredes, R., Garcia-Sesnich, J., Ortega, A.V., Gamonal, J., and Hernandez, M. (2012). Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm (Lond)* 9, 8.

Diaz, L., Hoare, A., Soto, C., Bugueno, I., Silva, N., Dutzan, N., Venegas, D., Salinas, D., Perez-Donoso, J.M., Gamonal, J., *et al.* (2015). Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe* 33, 25-32.

Dugast, A.S., Tonelli, A., Berger, C.T., Ackerman, M.E., Sciaranghella, G., Liu, Q., Sips, M., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Ghebremichael, M., *et al.* (2011). Decreased Fc receptor expression on innate immune cells is associated with impaired antibody-mediated cellular phagocytic activity in chronically HIV-1 infected individuals. *Virology* 415, 160-167.

Duvallet, E., Semerano, L., Assier, E., Falgarone, G., and Boissier, M.C. (2011). Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med* 43, 503-511.

Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21-35.

Etzerodt, A., and Moestrup, S.K. (2013). CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 18, 2352-2363.

Fatemi, K., Radvar, M., Rezaee, A., Rafatpanah, H., Azangoo khiavi, H., Dadpour, Y., and Radvar, N. (2013). Comparison of relative TLR-2 and TLR-4 expression level of disease and healthy gingival tissue of smoking and non-smoking patients and periodontally healthy control patients. *Aust Dent J* 58, 315-320.

Fernández, A., Cardenas, A.M., Astorga, J., Veloso, P., Alvarado, A., Merino, P., Pino, D., Reyes-Court, D., and Hernandez, M. (2019). Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Investig*.

Fernández, A., Veloso, P., Astorga, J., Rodriguez, C., Torres, V.A., Valdes, M., Garrido, M., Gebicke-Haerter, P.J., and Hernandez, M. (2020). Epigenetic regulation of TLR2-mediated periapical inflammation. *Int Endod J* 53, 1229-1237.

Garrido, M., Cardenas, A.M., Astorga, J., Quinlan, F., Valdes, M., Chaparro, A., Carvajal, P., Pussinen, P., Huaman-Chipana, P., Jalil, J.E., *et al.* (2019). Elevated Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in Young Adults with Endodontic Apical Lesions. *J Endod* 45, 111-115.

Garrido, M., Dezerega, A., Bordagaray, M.J., Reyes, M., Vernal, R., Melgar-Rodriguez, S., Ciuchi, P., Paredes, R., Garcia-Sesnich, J., Ahumada-Montalva, P., *et al.* (2015). C-reactive protein expression is up-regulated in apical lesions of endodontic origin in association with interleukin-6. *J Endod* 41, 464-469.

Gazivoda, D., Dzopalic, T., Bozic, B., Tatomirovic, Z., Brkic, Z., and Colic, M. (2009). Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med* 38, 605-611.

Gebbia, J.A., Coleman, J.L., and Benach, J.L. (2004). Selective induction of matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* via toll-like receptor 2 in monocytes. *J Infect Dis* 189, 113-119.

Guo, J., Yang, D., Okamura, H., Teramachi, J., Ochiai, K., Qiu, L., and Haneji, T. (2014). Calcium hydroxide suppresses *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide-induced bone destruction. *J Dent Res* 93, 508-513.

Gutmann, J.L., Baumgartner, J.C., Gluskin, A.H., Hartwell, G.R., and Walton, R.E. (2009). Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod* 35, 1658-1674.

Hajishengallis, G., Darveau, R.P., and Curtis, M.A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 10, 717-725.

Hajishengallis, G., and 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, 409-419.

Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M.A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M.A., McIntosh, M.L., Alsam, A., Kirkwood, K.L., Lambris, J.D., *et al.* (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 10, 497-506.

Hargreaves, K.M., Goodis, H.E., and Tay, F.R. (2012). Seltzer and Bender's Dental Pulp (Quintessence Pub.).

Herath, T.D., Darveau, R.P., Seneviratne, C.J., Wang, C.Y., Wang, Y., and Jin, L. (2013). Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF-kappaB signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS One* 8, e58496.

Herath, T.D., Darveau, R.P., Seneviratne, C.J., Wang, C.Y., Wang, Y., and Jin, L. (2016). Heterogeneous *Porphyromonas gingivalis* LPS modulates immuno-inflammatory response, antioxidant defense and cytoskeletal dynamics in human gingival fibroblasts. *Sci Rep* 6, 29829.

Hernández-Caldera, A., Vernal, R., Paredes, R., Veloso-Matta, P., Astorga, J., and Hernandez, M. (2017). Human periodontal ligament fibroblasts synthesize C-reactive protein and Th-related cytokines in response to interleukin (IL)-6 trans-signalling. *Int Endod J*.

Hernández, M., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., Gonzalez, F.E., Vernal, R., Sorsa, T., and Gamonal, J. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res* *90*, 1164-1170.

Hilda, J.N., Selvaraj, A., and Das, S.D. (2018). Mycobacterium tuberculosis H37Rv is more effective compared to vaccine strains in modulating neutrophil functions: an in vitro study. *FEMS Immunol Med Microbiol* *66*, 372-381.

Hoare, A., Bravo, D., Martinic, M., Valvano, M.A., Contreras, I., and Alvarez, S.A. (2012). The normal chain length distribution of the O antigen is required for the interaction of *Shigella flexneri* 2a with polarized Caco-2 cells. *Biol Res* *45*, 21-26.

Hogarth, P.M., and Pietersz, G.A. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 311-331.

Holden, J.A., Attard, T.J., Laughton, K.M., Mansell, A., O'Brien-Simpson, N.M., and Reynolds, E.C. (2014). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun* *82*, 4190-4203.

Hollenbach, P.W., Nguyen, A.N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N., Krushel, L., Aukerman, S.L., Heise, C., and MacBeth, K.J. (2010). A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One* *5*, e9001.

Horiba, N., Maekawa, Y., Abe, Y., Ito, M., Matsumoto, T., and Nakamura, H. (1991). Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* *71*, 492-495.

Hristodorov, D., Mladenov, R., Huhn, M., Barth, S., and Thepen, T. (2012). Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases. *Toxins (Basel)* *4*, 676-694.

Hsiao, W.W., Li, K.L., Liu, Z., Jones, C., Fraser-Liggett, C.M., and Fouad, A.F. (2012). Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics* *13*, 345.

Hulett, M.D., and Hogarth, P.M. (1998). The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* *35*, 989-996.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* *9*, 361-368.

Kato, H., Taguchi, Y., Tominaga, K., Umeda, M., and Tanaka, A. (2014). *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol* *59*, 167-175.

Kiyama-Kishikawa, M., Hiratsuka, K., and Abiko, Y. (2005). Gene expression profiling and characterization under hemin limitation in *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Sci* *47*, 191-197.

Krutzik, S.R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M.T., Liu, P.T., Sharfstein, S.E., Graeber, T.G., Sieling, P.A., Liu, Y.J., Rea, T.H., *et al.* (2005). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* *11*, 653-660.

Lam, R.S., O'Brien-Simpson, N.M., Lenzo, J.C., Holden, J.A., Brammar, G.C., Walsh, K.A., McNaughtan, J.E., Rowler, D.K., Van Rooijen, N., and Reynolds, E.C. (2014). Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol* *193*, 2349-2362.

Lamont, R.J., Chan, A., Belton, C.M., Izutsu, K.T., Vasel, D., and Weinberg, A. (1995). *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* *63*, 3878-3885.

Langjahr, P., Diaz-Jimenez, D., De la Fuente, M., Rubio, E., Golenbock, D., Bronfman, F.C., Quera, R., Gonzalez, M.J., and Hermoso, M.A. (2014). Metalloproteinase-dependent TLR2 ectodomain shedding is involved in soluble toll-like receptor 2 (sTLR2) production. *PLoS One* *9*, e104624.

Liljestrang, J.M., Mantyla, P., Paju, S., Buhlin, K., Kopra, K.A., Persson, G.R., Hernandez, M., Nieminen, M.S., Sinisalo, J., Tjaderhane, L., *et al.* (2016). Association of Endodontic Lesions with Coronary Artery Disease. *J Dent Res* *95*, 1358-1365.

Liu, R., Desta, T., Raptis, M., Darveau, R.P., and Graves, D.T. (2008). *P. gingivalis* and *E. coli* lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol* *79*, 1241-1247.

Ma, N., Yang, D., Okamura, H., Teramachi, J., Hasegawa, T., Qiu, L., and Haneji, T. (2017). Involvement of interleukin23 induced by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. *Mol Med Rep* *15*, 559-566.

Maess, M.B., Wittig, B., Cignarella, A., and Lorkowski, S. (2013). Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods* *402*, 76-81.

Marchesan, J., Jiao, Y., Schaff, R.A., Hao, J., Morelli, T., Kinney, J.S., Gerow, E., Sheridan, R., Rodrigues, V., Paster, B.J., *et al.* (2016). TLR4, NOD1 and NOD2 mediate immune recognition of putative newly identified periodontal pathogens. *Mol Oral Microbiol* *31*, 243-258.

Marinho, A.C., Martinho, F.C., Leite, F.R., Nascimento, G.G., and Gomes, B.P. (2015). Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *J Endod* *41*, 817-823.

- Marolda, C.L., Lahiry, P., Vines, E., Saldias, S., and Valvano, M.A. (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol* 347, 237-252.
- Martin, M., Katz, J., Vogel, S.N., and Michalek, S.M. (2001). Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol* 167, 5278-5285.
- Martinho, F.C., Leite, F.R., Chiesa, W.M., Nascimento, G.G., Feres, M., and Gomes, B.P. (2014). Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. *J Endod* 40, 484-489.
- Menezes, R., Garlet, T.P., Letra, A., Bramante, C.M., Campanelli, A.P., Figueira Rde, C., Sogayar, M.C., Granjeiro, J.M., and Garlet, G.P. (2008). Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod* 34, 932-938.
- Mills, C.D. (2015). Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol* 6, 212.
- Mirucki, C.S., Abedi, M., Jiang, J., Zhu, Q., Wang, Y.H., Safavi, K.E., Clark, R.B., and Nichols, F.C. (2014). Biologic activity of *porphyromonas endodontalis* complex lipids. *J Endod* 40, 1342-1348.
- Montagner, F., Jacinto, R.C., Signoretti, F.G., Sanches, P.F., and Gomes, B.P. (2012). Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *J Endod* 38, 158-162.
- Mori, Y., Yoshimura, A., Ukai, T., Lien, E., Espevik, T., and Hara, Y. (2003). Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 18, 54-58.
- Nair, P.N. (2004). Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 348-381.
- Nativel, B., Couret, D., Giraud, P., Meilhac, O., d'Hellencourt, C.L., Viranaicken, W., and Da Silva, C.R. (2017). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human. *Sci Rep* 7, 15789.
- Nociti, F.H., Jr., Casati, M.Z., and Duarte, P.M. (2015). Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontol* 2000 67, 187-210.
- Ortega, X., Hunt, T.A., Loutet, S., Vinion-Dubiel, A.D., Datta, A., Choudhury, B., Goldberg, J.B., Carlson, R., and Valvano, M.A. (2005). Reconstitution of O-specific lipopolysaccharide expression in *Burkholderia cenocepacia* strain J2315, which is associated with transmissible infections in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 187, 1324-1333.
- Ortiz, M.C., Lefimil, C., Rodas, P.I., Vernal, R., Lopez, M., Acuna-Castillo, C., Imarai, M., and Escobar, A. (2015). *Neisseria gonorrhoeae* Modulates Immunity by Polarizing Human Macrophages to a M2 Profile. *PLoS One* 10, e0130713.
- Papadopoulos, G., Weinberg, E.O., Massari, P., Gibson, F.C., 3rd, Wetzler, L.M., Morgan, E.F., and Genco, C.A. (2013). Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J Immunol* 190, 1148-1157.
- Paramonov, N., Rangarajan, M., Hashim, A., Gallagher, A., Aduse-Opoku, J., Slaney, J.M., Hounsell, E., and Curtis, M.A. (2005). Structural analysis of a novel anionic polysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* strain W50 related to Arg-gingipain glycans. *Mol Microbiol* 58, 847-863.
- Paraskevas, S., Huizinga, J.D., and Loos, B.G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 35, 277-290.
- Park CJ, Park DS, Yoo HM, Oh TS, and SS., L. (2002). IL-1 and TNF-alpha release in human polymorphonuclear leukocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Korean Acad Conserv Dent* 5, 463-472.
- Pasqualini, D., Bergandi, L., Palumbo, L., Borraccino, A., Dambra, V., Alovise, M., Migliaretti, G., Ferraro, G., Ghigo, D., Bergerone, S., *et al.* (2012). Association among oral health, apical periodontitis, CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod* 38, 1570-1577.
- Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J.A., and Dewhirst, F.E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 42, 80-87.
- Paterson, G.K., Cone, D.B., Peters, S.E., and Maskell, D.J. (2009). The enzyme phosphoglucomutase (Pgm) is required by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for O-antigen production, resistance to antimicrobial peptides and in vivo fitness. *Microbiology (Reading)* 155, 3403-3410.
- Pereira, C.V., Stipp, R.N., Fonseca, D.C., Pereira, L.J., and Hofling, J.F. (2011). Detection and clonal analysis of anaerobic bacteria associated to endodontic-periodontal lesions. *J Periodontol* 82, 1767-1775.
- Perez-Chaparro, P.J., Goncalves, C., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Lobao, E., Tamashiro, N., Duarte, P., and Feres, M. (2014). Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res* 93, 846-858.
- Petersen, J., Glassl, E.M., Nasser, P., Crismani, A., Luger, A.K., Schoenherr, E., Bertl, K., and Glodny, B. (2014). The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. *Clin Oral Investig* 18, 1813-1823.
- Promsudthi, A., Poomsawat, S., and Limsricharoen, W. (2013). The role of Toll-like receptor 2 and 4 in gingival tissues of chronic periodontitis subjects with type 2 diabetes. *J Periodontol Res* 49, 346-354.

- Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Paramonov, N., Hashim, A., Bostanci, N., Fraser, O.P., Tarelli, E., and Curtis, M.A. (2008). Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol* *190*, 2920-2932.
- Ravetch, J.V., and Kinet, J.P. (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol* *9*, 457-492.
- Reife, R.A., Coats, S.R., Al-Qutub, M., Dixon, D.M., Braham, P.A., Billharz, R.J., Howald, W.N., and Darveau, R.P. (2006). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol* *8*, 857-868.
- Rezania, S., Amirmozaffari, N., Tabarraei, B., Jeddi-Tehrani, M., Zarei, O., Alizadeh, R., Masjedian, F., and Zarnani, A.H. (2011). Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol* *3*, 3-9.
- Rocas, I.N., Siqueira, J.F., Jr., and Debelian, G.J. (2011). Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod* *37*, 1206-1212.
- Rojo-Botello, N.R., Garcia-Hernandez, A.L., and Moreno-Fierros, L. (2012). Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res* *47*, 62-73.
- Roomi, M.W., Monterrey, J.C., Kalinovsky, T., Rath, M., and Niedzwiecki, A. (2010). In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncol Rep* *23*, 605-614.
- Rosadini, C.V., and Kagan, J.C. (2017). Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immunol* *44*, 14-19.
- Salinas-Muñoz, M., Garrido-Flores, M., Baeza, M., Huaman-Chipana, P., Garcia-Sesnich, J., Bologna, R., Vernal, R., and Hernandez, M. (2017). Bone resorptive activity in symptomatic and asymptomatic apical lesions of endodontic origin. *Clin Oral Investig* *21*, 2613-2618.
- Schappe, M.S., and Desai, B.N. (2018). Measurement of TLR4 and CD14 Receptor Endocytosis Using Flow Cytometry. *Bio Protoc* *8*.
- Seol, J.H., Cho, B.H., Chung, C.P., and Bae, K.S. (2006). Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* *32*, 110-114.
- Shapira, L., Champagne, C., Van Dyke, T.E., and Amar, S. (1998). Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* *66*, 2736-2742.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* *233*, 6425-6440.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000414.
- Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Aguillon, J.C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R., *et al.* (2008). Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol* *35*, 206-214.
- Sima, C., and Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontol* *2000* *63*, 80-101.
- Stresmann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H., and Lyko, F. (2006). Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* *66*, 2794-2800.
- Sugawara, Y., Uehara, A., Fujimoto, Y., Kusumoto, S., Fukase, K., Shibata, K., Sugawara, S., Sasano, T., and Takada, H. (2006). Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res* *85*, 524-529.
- Sun, Y., Li, H., Sun, M.J., Zheng, Y.Y., Gong, D.J., and Xu, Y. (2014). Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*: alternations in Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway. *Inflammation* *37*, 268-276.
- Takashiba, S., Van Dyke, T.E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A.W., and Shapira, L. (1999). Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infect Immun* *67*, 5573-5578.
- Tang, Y., Sun, F., Li, X., Zhou, Y., Yin, S., and Zhou, X. (2011). *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Endod* *37*, 1653-1658.
- Tsai, C.M., and Frasch, C.E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* *119*, 115-119.
- Veloso, P., Fernandez, A., Terraza-Aguirre, C., Alvarez, C., Vernal, R., Escobar, A., and Hernandez, M. (2020). Macrophages skew towards M1 profile through reduced CD163 expression in symptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Investig* *24*, 4571-4581.
- Wang, J., Jiang, Y., Chen, W., Zhu, C., and Liang, J. (2012). Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* *38*, 954-959.



Wang, Q., Zhou, X.D., Zheng, Q.H., Wang, Y., Tang, L., and Huang, D.M. (2010). Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. *J Endod* 36, 1790-1795.

Wara-aswapati, N., Chayasadam, A., Surarit, R., Pitiphat, W., Boch, J.A., Nagasawa, T., Ishikawa, I., and Izumi, Y. (2013). Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 84, 1010-1018.

Weber, M., Schlittenbauer, T., Moebius, P., Buttner-Herold, M., Ries, J., Preidl, R., Geppert, C.I., Neukam, F.W., and Wehrhan, F. (2017). Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Clin Oral Investig* 22, 385-394.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., *et al.* (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 1144-1150.

Yi, E.C., and Hackett, M. (2000). Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst* 125, 651-656.

Yu, T., Zhao, L., Huang, X., Ma, C., Wang, Y., Zhang, J., and Xuan, D. (2016). Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *J Periodontol* 87, 1092-1102.

Yu, Y., Qiu, L., Guo, J., Qu, L., Xu, L., and Zhong, M. (2014). [Effect of lipopolysaccharides from *Porphyromonas endodontalis* on the expression of macrophage colony stimulating factor in mouse osteoblasts]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 49, 535-539.

Zhang, Y., Gaekwad, J., Wolfert, M.A., and Boons, G.J. (2008). Synthetic tetra-acylated derivatives of lipid A from *Porphyromonas gingivalis* are antagonists of human TLR4. *Org Biomol Chem* 6, 3371-3381.

Zhou, L.N., Bi, C.S., Gao, L.N., An, Y., Chen, F., and Chen, F.M. (2018). Macrophage polarization in human gingival tissue in response to periodontal disease. *Oral Diseases*.

Zhuang, Z., Yoshizawa-Smith, S., Glowacki, A., Maltos, K., Pacheco, C., Shehabeldin, M., Mulkeen, M., Myers, N., Chong, R., Verdelis, K., *et al.* (2019). Induction of M2 Macrophages Prevents Bone Loss in Murine Periodontitis Models. *J Dent Res* 98, 200-208.

### XIII. ANEXO

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo

| Anticuerpo | Fluoróforo           | Origen | Marca     | # Catalogo |
|------------|----------------------|--------|-----------|------------|
| CD14       | Alexa Fluor 700      | Mouse  | BioLegend | 325614     |
| CD64       | Brilliant Violet 510 | Mouse  | BioLegend | 305027     |
| CD80       | FICT                 | Mouse  | BioLegend | 305205     |
| CD163      | PE/Cy7               | Mouse  | BioLegend | 326513     |
| CD206      | Brilliant Violet 421 | Mouse  | BioLegend | 321125     |
| TLR2       | PE                   | Mouse  | BioLegend | 309708     |
| TLR4       | APC                  | Mouse  | BioLegend | 312816     |

Tabla 2. Partidores utilizados para las secuencias blanco de ARN y ADN para qPCR

| ARN Mensajero Blanco | Secuencia Partidor Forward | Secuencia Partidor Reverse |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| TNF- $\alpha$        | 5-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3  | 5-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3   |
| IL-6                 | 5-GCCCAGCTATGAACTCCTTCT-3  | 5-GAAGGCAGCAGGCAACAC-3     |
| TLR2                 | 5-CTCTCGGTGTCGGAATGTC-3    | 5-AGGATCAGCAGGAACAGAGC-3   |
| IL-10                | 5-TGGGGGAGAACCTGAAGAC-3    | 5-CCTTGCTCTTGTTCACAGG-3    |
| IL-12p35             | 5-CACTCCCAAACCTGCTGAG-3    | 5-TCTCTTCAGAAGTGCAAGGGTA-3 |
| 18S ARNr             | 5-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3   | 5-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3   |

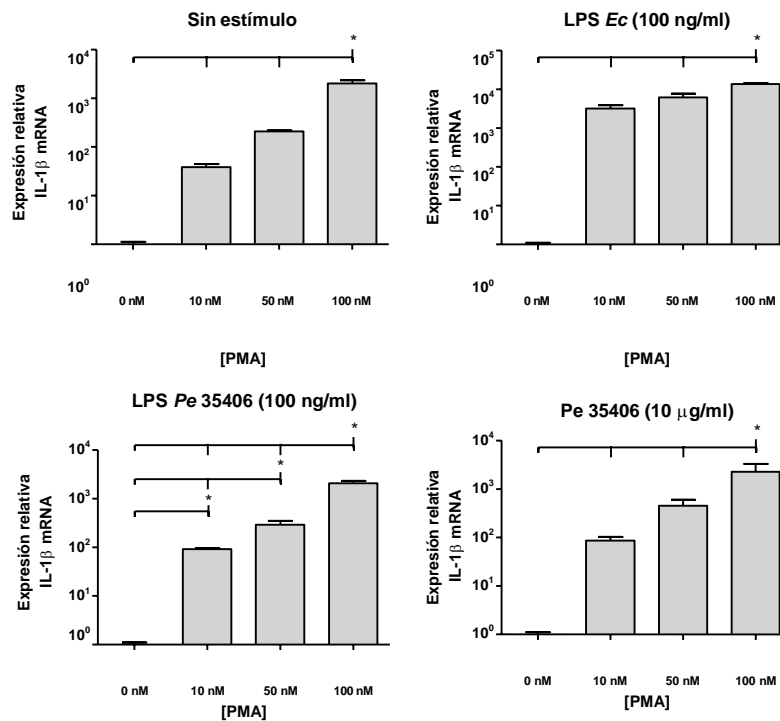


Figura Anexo 1. Expresión génica de IL-1 $\beta$  en células THP-1 sin diferenciar o diferenciadas a macrófagos con PMA 10 nM, 50 nM, 100 nM. Las células fueron estimuladas con LPS *E. coli* de origen comercial (0,1  $\mu$ g/ml), LPS *P. endodontalis* ATCC 35406 (0,1 o 10  $\mu$ g/ml) por 24 horas. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con ARNr 18S y expresado como la diferencia entre  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Se realizó análisis estadístico con los triplicados de células diferenciadas con diferentes concentraciones de PMA versus controles sin diferenciar (n=1). Los datos fueron graficados como media  $\pm$  SD y analizados mediante test estadístico one-way ANOVA con post-hoc Bonfferoni test. \* p < 0,05.

## ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

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

INFORME N°:2016/08

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

**Dr. Eduardo Fernández**  
Presidente CEC

**Sra. Paulina Navarrete**  
Secretaria CEC

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

**Dr. Mauricio Baeza**  
Miembro permanente CEC

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

**Dra. Weronika Weil**  
Miembro permanente CEC

**Dr. Rodrigo Cabello**  
Miembro permanente CEC

**Dr. Alfredo Molina**  
Miembro alterno CEC

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

## 8.- Fundamentación de la aprobación

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

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

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

  
Dr. Eduardo Fernández G.  
Presidente CEC



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

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON TOMA DE MUESTRA DE SANGRE

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entienda, si es así puede pedir explicaciones al investigador.

**Investigador Principal:** Marcela Hernández Ríos. Email: [mhernandezrios@odontologia.uchile.cl](mailto:mhernandezrios@odontologia.uchile.cl). Fono: 229781833

**Título del Proyecto:** PERFILES DE RESPUESTA DE MACRÓFAGOS INDUCIDOS POR PATÓGENOS ENDODÓNTICOS Y SU REGULACIÓN EPIGENÉTICA COMO DETERMINANTES PARA LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA PERIODONTITIS APICAL CRÓNICA

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión.

### 1.- Solicitud de participación

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un proyecto de investigación sobre periodontitis apical crónica, bajo la supervisión de la Dra. Marcela Hernández Ríos, de la Universidad de Chile. Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dental que generalmente se produce como consecuencia de caries y evoluciona con el tiempo hacia la formación de una lesión de los tejidos que rodean a la raíz del diente (lesión periapical). El tratamiento indicado para estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas. El propósito de esta investigación es caracterizar la infección y respuesta inflamatoria en individuos afectados en forma previa y posterior al tratamiento endodóntico. Para esto, obtendremos muestras de lesiones periapicales o ligamento periodontal sano en dientes con indicación de extracción, o bien, fluido de los canales radiculares y sangre de los voluntarios con indicación de endodoncia o controles y su participación consistirá exclusivamente en donar muestras que serán tomadas por profesionales expertos con estricta confidencialidad de sus datos.

### 2. –Si usted participa usted deberá realizar:

- Una entrevista previa a la toma de muestra. Además se le realizará un examen clínico oral gratuito. La entrevista dura aproximadamente 15 minutos; la información suministrada en la entrevista es confidencial.
- En el caso de estar indicado el tratamiento de canal, se extraerán 200 ml de sangre de su brazo antes del tratamiento y en los controles de uno, seis y 12 meses post tratamiento. Una parte de esta sangre (leucocitos mononucleares y suero) se usará para determinar la respuesta inmune celular asociada a esta patología oral. Se analizarán en laboratorio del Hospital Clínico de la Universidad de Chile perfil lipídico, hemoglobina glicosilada y proteína C reactiva. Además se le tomarán muestras del canal radicular del diente afectado durante la realización del tratamiento de canal (endodóntico). En el caso de no tener dientes con periodontitis apical (controles), sólo se le tomará una muestra de sangre durante la primera visita. En el caso de tener indicación de extracción de dientes con periodontitis apical o dientes sanos por indicación de ortodoncia, se extraerán los tejidos blandos adheridos al diente para análisis de la respuesta inmune local.

### 3. Criterios de inclusión.

Sujetos sanos (sin enfermedad actual general ni periodontitis apical) hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 45 años sin enfermedades generales.

### 4. Criterios de exclusión.

Individuos en tratamiento antibiótico o antiinflamatorio en los últimos 3 meses previos a la atención odontológica.

### 3.- Riesgo y efectos adversos que pueden estar asociados a la investigación

Usted puede experimentar ligeras molestias en el sitio de la extracción de la sangre. Algunas personas experimentan mareos o sensación de debilidad general tras la extracción de la muestra. En el caso de las muestras de fluido de canal radicular o tejidos asociados a dientes extraídos, no existen riesgos ni molestias propias de la obtención de muestra.



**4.- Manejo y difusión de la información**

- a) Los resultados de la investigación son estrictamente con fines científicos y no comerciales. No se entregará información de la investigación a compañías de seguros ni otras personas o instituciones sin su previa autorización.
- b) Los resultados de la investigación podrán ser usados en presentaciones a congresos científicos o publicados en revistas científicas nacionales o internacionales.
- c) A su muestra se le asignará un código numérico. Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del donante.

**5.- Beneficios para usted/sociedad:**

- a) En el caso de realizarse examen de sangre, como beneficios obtendrá examen dental clínico y radiográfico, limpieza dental, y exámenes de perfil lipídico, CRP y hemoglobina glicosilada sin costo.

Usted estará haciendo una libre y generosa donación para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuras generaciones. La participación es voluntaria y usted puede rehusar a participar y retirarse de investigación cualquier momento sin ninguna penalidad, en este caso sus leucocitos serán eliminados.

**6.- Seguimiento**

Para proteger sus derechos, la agencia que suministra los fondos (FONDECYT) para este proyecto podría en algún momento inspeccionar los registros suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse de que sus derechos han sido protegidos en este proyecto.

**7. Compensaciones**

En caso de daños la compensación será en un 100% de cargo del investigador responsable, liberando de gastos al sujeto y comprenderá la atención médica u odontológica requerida.

**8.- Aclaraciones**

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o si experimenta cualquier problema, puede llamar al investigador responsable Marcela Hernández Ríos teléfonos 229781833.



Si Ud. desea consultar sobre sus derechos como sujeto de investigación o piensa que estos han sido vulnerados se puede dirigir al representante del Comité Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: DR. Eduardo Fernández al teléfono 229781742.

**He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación.**

Nombre del Participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma Participante

Fecha

\_\_\_\_\_  
RUT

\_\_\_\_\_  
Firma Investigador Principal

**ANEXO 1. FICHA CLÍNICA LPAs Y LS**

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| Nombre:   |  | ID:  |  |
| Fecha ingreso:  |  | Diente:  |  |
| Género: Femenino <input type="checkbox"/> Masc ulino <input type="checkbox"/>   |  | Edad:  |  |
| Nivel educacional: básica incompleta <input type="checkbox"/> básica completa <input type="checkbox"/> media completa <input type="checkbox"/> superior completa <input type="checkbox"/> |  |  |  |
| ANAMNESIS   |  |  |  |
| Enfermedad sistémica actual   | No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>                | Especificar:   |  |
| Tratamiento médico los últimos 3 meses  | No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>                | Especificar:   |  |
| EXAMEN CLÍNICO  |  |  |  |
| Periodontitis crónica   | Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>                | Gingivitis   | Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>                |
| Fuma actualmente  | Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>                |  |  |
| DIAGNÓSTICO   |  |  |  |
| Diente:   | PAA <input type="checkbox"/>   | PAS <input type="checkbox"/> Fístula <input type="checkbox"/> Absceso <input type="checkbox"/> | Sano <input type="checkbox"/>  |
| Diámetro basal de la lesión radiográfica (mm)   | Vertical:  |  | Horizontal :   |
| Tests de sensibilidad (frío/calor)  | Positivo <input type="checkbox"/><br>Negativo <input type="checkbox"/> | Percusión  | Positiva <input type="checkbox"/><br>Negativa <input type="checkbox"/> |