

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



“Efecto del ADN de *Porphyromonas endodontalis* sobre el fenotipo inflamatorio y participación de TLR -9 en macrófagos humanos”

JOAQUÍN ANDRÉS LUCERO MORA
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Financiamiento: FONDECYT 1200098.

Tutor principal: Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos.

**Tutor(es) asociado(s): Dra. Montserrat Reyes Rojas.
Dra. Anilei Hoare Teuche.**

**Santiago - Chile
2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGICA
ESCUELA DE GRADUADOS**

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



“Efecto del ADN de *Porphyromonas endodontalis* sobre el fenotipo inflamatorio y participación de TLR -9 en macrófagos humanos”

**JOAQUÍN ANDRÉS LUCERO MORA
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Financiamiento: FONDECYT 1200098.

Tutor principal: Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos.

**Tutor(es) asociado(s): Dra. Montserrat Reyes Rojas.
Dra. Anilei Hoare Teuche.**

**Santiago - Chile
2023**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
ESCUELA DE GRADUADOS**

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato:


Joaquín Andrés Lucero Mora

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día 5 de octubre de 2023.

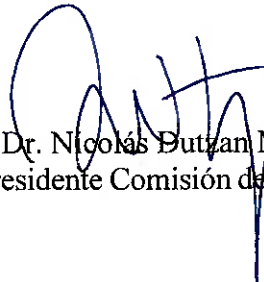
COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Dra. Constanza Martínez Cardozo



Dr. Alfredo Molina Berríos



Dr. Nicolás Dutzan Muñoz
(Presidente Comisión de Examen)

DEDICATORIA

“A los que ya no están y a los que continúan en el camino de mi vida”

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora de tesis, Profesora Dra. Marcela Hernández por su tiempo, ayuda, apoyo, conocimientos entregados durante todo el transcurso de mi Magíster y sobre todo por creer en mí.

A mis tutoras, Profesoras Dra. Anilei Hoare y Dra. Montserrat Reyes, por sus tiempos, compartir sus conocimientos y creer en mi estudio.

A Jessica Astorga, Pablo Veloso, Elizabeth Pellegrini, Bernardita Parada, Daniela Salinas, M. Paz Pruneda y Marcelo Rodríguez por su imprescindible apoyo técnico entregado.

A mis amigos del Laboratorio de Biología Periodontal, M. José Bordagaray, David González, Sebastián Araneda, Sebastián Castro, Mauricio Garrido, Michelle García, Alfredo Sierra, Carolina Rojas, Daniel Sansores y principalmente a Alejandra Fernández por acompañarme y apoyarme en el mundo Científico.

A la comisión Revisora, por sus sugerencias y conocimientos que me permitieron mejorar mi tesis.

Al Profesor Alejandro Oyarzún por guiarme e iniciarme en el mundo científico e impulsarme a cursar el Magíster en Ciencias Odontológicas.

Gracias a mis Padres Julia Mora y Rodrigo Lucero, a cada uno de los miembros que componen mi familia, y a mis amigos por su apoyo incondicional.

A mi mascota Llaima por calentar mis pies durante las largas noches de estudio.

Gracias a mi compañera de vida Pilar Rebolledo por impulsarme a seguir mis sueños y apoyarme en todo momento.

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS:

- ✓ Root Canal Treatment Reduces C-reactive Protein-based Cardiovascular Risk In Clinically Healthy Young Individuals With Apical Periodontitis. Mauricio Garrido, María José Bordagaray, Catalina Schweitzer, Joaquín Lucero-Mora, Montserrat Reyes, Elizabeth Pellegrini, Patricia Hernández, Alejandra Fernández y Marcela Hernández. En revisión para ser publicado, 2023.
- ✓ Antimicrobial Copper Nanoparticles effect on supragingival oral bacteria. Nia Oetiker, Daniela Salinas, Joaquín Lucero-Mora, Rocío Orellana, Mariana Quiroz-Muñoz, Denisse Bravo y José Manuel Pérez-Donoso. En revisión para ser publicado, 2023.
- ✓ Efecto Proinflamatorio Del ADN De *P. endodontalis* Y Participación De Receptores Tipo Toll. Lucero J., Hoare A., Fernández A., Pellegrini E. y Hernández M. XVIII Jornada Internacional de Ciencias y Tecnología XVI Jornada de Becarios y Tesistas, Agosto, 2023, Argentina.
- ✓ El Tratamiento endodóntico Reduce El Riesgo Cardiovascular Basado En La Proteína C Reactiva En Individuos Con Periodontitis Apical. Bordagaray MJ, Garrido M, Lucero-Mora J, Pellegrini E, Hernández-Ríos P y Hernández M. XVIII. Jornada Internacional de Ciencias y Tecnología XVI Jornada de Becarios y Tesistas, Agosto, 2023, Argentina.
- ✓ Porphyromonas endodontalis DNA Activates NFκB via TLR9 in Human Macrophages. Lucero J., Reyes M., Fernández A., Bordagaray, M.J., Yáñez L., Pellegrini E., Bravo D., Hoare A. y Hernández M. IADR/LAR General Session with WCPD, 2023, Colombia.

- ✓ Apical Periodontitis Affects Human Blood Serum Levels of Monomeric CRP. Garrido C., Astorga J., Reyes M., Lucero J., Schweitzer C., Hernández P. y Hernández M. IADR/APR General Session, 2022, China.

- ✓ Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in endodontically-treated Young-adults with Apical Periodontitis. Lucero J., Garrido M., Vega C., Hernández P., Astorga J., y Hernández M. VII congreso de Región Latinoamericana de la IADR- LIV reunión Científica Anual SAIO, 2021, Argentina.

- ✓ Cardiovascular Risk And Endodontic Treatment In Adults With Apical Periodontitis. Lucero J., Garrido M., Vega C., Jiménez C. y Hernández M. IADR Chilean Division Meeting, 2020, Chile.

INDICE

INTRODUCCION	1
Periodontitis Apical.....	1
Papel del Lipopolisacárido y ADN de <i>P. endodontalis</i>	2
Receptores tipo Toll median la respuesta inflamatoria de macrófagos	3
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	8
METODOLOGIA	9
Diseño de estudio.....	9
Purificación de ADN bacteriano	9
Diferenciación de macrófagos a partir de células THP-1	10
Expresión génica de citoquinas inflamatorias por ADN de <i>P. endodontalis</i>	10
Participación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	12
Transcripción de TLR-9 inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	12
Activación de la vía NF-kB por ADN de <i>P. endodontalis</i>	13
Inmunofluorescencia.....	13
Inmuno western blot.....	14

Participación de TLR-9 sobre la respuesta inflamatoria inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	15
Participación de TLR-2 y 4 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	15
Transcripción de TLR-2 y 4 frente a ADN de <i>P. endodontalis</i>	16
Participación de TLR-2 y 4 sobre el efecto del ADN de <i>P. endodontalis</i> sobre la expresión génica de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12 TNF- α e IL-10	16
RESULTADOS	18
El ADN de <i>P. endodontalis</i> induce la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10	18
Participación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	19
El ADN de <i>P. endodontalis</i> no indujo cambios en los niveles de mRNA de TLR-9	19
El ADN de <i>P. endodontalis</i> induce la activación de NF-kB vía TLR-9	20
TLR-9 participa en la expresión génica de IL-6 por ADN de <i>P. endodontalis</i> , aislado clínico	22
Participación de TLR-2 y 4 en la respuesta inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	23
El ADN de <i>P. endodontalis</i> no indujo cambios en los niveles de mRNA de TLR-2 y 4	23
TLR-2 y/o 4 participan en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 al estimular con ADN de <i>P. endodontalis</i>	24
DISCUSION	26
El ADN de <i>P. endodontalis</i> induce la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10	26
El ADN de <i>P. endodontalis</i> induce la activación de NF-kB vía TLR-9	27
TLR-9 participa en la expresión génica de IL-6 inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	28
TLR-2 y TLR-4 participan en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 inducida por ADN de <i>P. endodontalis</i>	29

El ADN de <i>P. endodontalis</i> aislado clínico indujo un efecto inflamatorio más marcado en comparación con la cepa de referencia ATCC 35406.....	30
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33
APENDICES.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con ADN de <i>P. endodontalis</i> ATCC 35406 y aislado clínico	11
Figura 2. Expresión de TLR-9 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con ADN de <i>P. endodontalis</i> ATCC 35406 y <i>P. endodontalis</i> aislado clínico	12
Figura 3. Translocación nuclear de NF-kB en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados ADN de <i>P. endodontalis</i> ATCC 35406 y <i>P. endodontalis</i> aislado clínico.....	13
Figura 4. Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y IL-10 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con ADN de <i>P. endodontalis</i> ATCC 35406, aislado clínico y tratados con inhibidor de TLR-9	14
Figura 5. Expresión de TLR-9 en macrófagos estimulados con ADN de <i>P. endodontalis</i> ATCC 35406 y <i>P. endodontalis</i> aislado clínico	15
Figura 6. Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y IL-10 en macrófagos <i>in vitro</i> estimulados con ADN de <i>P. endodontalis</i> ATCC 35406 y tratados con inhibidor de TLR 2 y 4	15

I.- RESUMEN:

Introducción: La periodontitis apical es una condición osteolítica inflamatoria-infecciosa que afecta al periodonto apical. Si bien, *Porphyromonas endodontalis* es un patógeno clave, definido en base a su prevalencia y factores de virulencia, se desconoce el efecto del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Porphyromonas endodontalis* en la respuesta inflamatoria mediada por *Porphyromonas endodontalis*, así como los receptores involucrados en su reconocimiento y la posible interacción potencial entre ellos.

Objetivo: Evaluar *in vitro* si el ADN de *P. endodontalis* induce una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-9 en macrófagos humanos.

Metodología: Macrófagos diferenciados de monocitos humanos de línea THP-1 fueron estimulados con ADN ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) de aislado clínico endodóntico o una cepa de referencia de *Porphyromonas endodontalis*. Se determinó la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10, y TLR-9, -2 y -4 por RT q-PCR. Los niveles de activación de NF- κ B se determinaron mediante la fosforilación de la subunidad p65 por Inmuno Western blot y su traslocación al núcleo, usando inmunofluorescencia. Finalmente se evaluó la participación de TLR-9, 2 y 4 mediante el uso de un inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18; $1 \mu\text{M}$) y un inhibidor de TLR-2 y 4 (OxPAPC; $30 \mu\text{g ml}^{-1}$). Como control negativo se utilizaron células sin estimular expuestas a medio sin ADN de *P. endodontalis*. Como control positivo se utilizó un agonista de TLR-9 (ODN 2006; $2,5 \mu\text{M}$). Cada experimento se realizó 3 veces y en triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis según la distribución de los datos.

Resultados: Los macrófagos estimulados con ADN de la cepa de referencia *P. endodontalis* ATCC 35406 indujeron aumento de mRNA de TNF- α e IL-6, mientras que el aislado clínico indujo aumentos de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por encima del control sin estimular. Respecto de la participación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por el ADN de *P. endodontalis*, si bien no

se observaron cambios en los niveles de mRNA de TLR-9, el ADN de *P. endodontalis* indujo la activación de NF- κ B vía TLR-9, la que fue más marcada para el aislado clínico. Además, existió participación de TLR-9 en la expresión génica de IL-6 por ADN de ATCC 35406 y del aislado clínico de *P. endodontalis*. Nuestros resultados sugieren también la participación TLR-2 y 4 en la respuesta inducida por ADN de *P. endodontalis*, lo que se evidenció en la disminución de la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 al inhibir estos receptores.

Conclusión: El ADN de *P. endodontalis* induce una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-9 y señalización vía NF- κ B, e involucraría la participación de TLR-2 y/o 4 en macrófagos humanos.

ABSTRACT:

Introduction: Apical periodontitis is an inflammatory-infectious osteolytic condition affecting the apical periodontium. Although *Porphyromonas endodontalis* is a key pathogen, defined on the basis of its prevalence and virulence factors, the effect of *Porphyromonas endodontalis* deoxyribonucleic acid (DNA) on the *Porphyromonas endodontalis*-mediated inflammatory response is unknown, as well as the receptors involved in its recognition and the possible potential interaction between them.

Methodology: Macrophages differentiated from human monocytes of line THP-1 were stimulated with DNA (100 µg ml⁻¹) of endodontic clinical isolate or a reference strain of *Porphyromonas endodontalis*. Gene expression of TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-10, and TLR-9, -2 and -4 was determined by RT q-PCR. NF-kB activation levels were determined by phosphorylation of the p65 subunit by Immuno Western blot and its translocation to the nucleus using immunofluorescence. Finally, the involvement of TLR-9, 2 and 4 was evaluated by using TLR-9 inhibitor (ODN INH-18; 1 µM) and TLR-2 and 4 inhibitor (OxPAPC; 30 µg ml⁻¹). Unstimulated cells exposed to *P. endodontalis* DNA-free medium were used as a negative control. A TLR-9 agonist (ODN 2006; 2.5 µM) was used as a positive control. Each experiment was performed 3 times and in triplicate. Statistical analysis of the results was performed by ANOVA or Kruskal-Wallis test according to the distribution of the data.

Results: Macrophages stimulated with DNA from the reference strain *P. endodontalis* ATCC 35406 induced increases in TNF-α and IL-6 mRNA, whereas the clinical isolate induced increases in TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 mRNA above the unstimulated control. Regarding the involvement of TLR-9 in the inflammatory response induced by *P. endodontalis* DNA, although no changes in TLR-9 mRNA levels were observed, *P. endodontalis* DNA induced NF-kB activation via TLR-9, which was more marked for the clinical isolate. In addition, there was TLR-9 involvement in IL-6 gene expression by ATCC 35406 DNA and the clinical isolate of *P. endodontalis*. Our results also suggest TLR-2 and 4

involvement in the DNA-induced response of *P. endodontalis*, which was evidenced by decreased expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 upon inhibition of these receptors.

Conclusion: *P. endodontalis* DNA induces a proinflammatory response mediated by TLR-9 and NF- κ B signaling, and would involve the participation of TLR-2 and/or 4 in human macrophages.

II.INTRODUCCION:

II.1. Periodontitis Apical.

La periodontitis apical (PA) corresponde a una enfermedad de origen dentario altamente prevalente y representa una de las principales causas de pérdida de dientes por urgencia odontológica ambulatoria en Chile (MINSAL, 2011). La PA es una condición osteolítica inflamatoria e infecciosa que afecta al periodonto apical, dependiendo de la respuesta inmunitaria del hospedero a los consorcios bacterianos dominados por bacterias Gram negativo anaerobias del sistema de canales radiculares (SCR) y sus respectivos subproductos, puede considerarse como una enfermedad heterogénea y manifestarse como un estadio agudo o crónico y asociarse a una lesión activa o inactiva (Cavalla et al., 2021; Garrido et al., 2019; Rôças et al., 2011). Las periodontitis apicales en estadio crónico pueden diagnosticarse como sintomáticas o asintomáticas y su sello distintivo es la formación de una lesión apical osteolítica de origen endodóntico (ALEO) (Garrido et al., 2019; Gutmann et al., 2009).

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* (Gutmann et al., 2009; Pereira et al., 2011; Seol et al., 2006) han sido reconocidas como agentes centrales para el desarrollo y la progresión de la PA (Seol et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que el género *Porphyromonas* es altamente prevalente en los canales radiculares de dientes con PA, mayoritariamente *Porphyromonas endodontalis* y *Porphyromonas gingivalis* (Bordagaray et al., 2021). Entre ellas, *P. gingivalis* es una especie asociada a periodontitis altamente estudiada que se detecta también en los canales radiculares (Bronzato et al., 2021; Jia et al., 2019; Sahingur et al., 2010; Silva et al., 2008). Se ha propuesto que otras especies relativamente menos estudiadas, como *P. endodontalis*, poseería un papel preponderante en el

desarrollo de las formas crónicas de periodontitis apical (Belstrøm et al., 2014; Colombo et al., 2012; Pérez-Chaparro et al., 2014).

II.2. Papel del Lipopolisacárido y ADN de *P. endodontalis*.

P. endodontalis es un bacilo anaerobio Gram negativo altamente asociado a infecciones endodónticas. *P. endodontalis* se ha identificado en el interior del SCR en dientes con necrosis pulpar y en dientes con PA (Tang et al., 2011). Estudios en población brasileña reportaron una prevalencia de *P. endodontalis* en el canal radicular de un 70% en dientes con PA (Wang et al., 2010). En Chile, *P. endodontalis* se ha descrito con una frecuencia de un 41% en el SCR de dientes con PA asociadas con ALEO (Bordagaray et al., 2021). Entre la gran variedad de factores de virulencia de *P. endodontalis*, se incluyen el lipopolisacárido (LPS) y ADN bacteriano. La prevalencia de *P. endodontalis* y la expresión de estos factores podría explicar los diferentes espectros de severidad de la enfermedad y el tipo de respuesta inflamatoria del hospedero (Bronzato et al., 2021; Jia et al., 2019; Wang et al., 2010).

Los LPS y ADN bacterianos son reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconocimiento de patrones (RRP), como los receptores tipo Toll (TLRs) en células presentadoras de antígenos. La activación de TLRs por PAMPs tiene un rol central en la patología de enfermedades periodontales al inducir una respuesta inmune pro-inflamatoria, además de funciones, tales como la fagocitosis, expresión de especies reactivas de oxígeno, citoquinas, metaloproteinasas de matriz, y la activación de respuestas celulares y humorales (Arancibia et al., 2007; Kim et al., 2015; Sima & Glogauer, 2013). Se ha estudiado extensamente la asociación de diferentes PAMPs con sus receptores en la etiología de la enfermedad periodontal, en especial los de *P. gingivalis*, un patobionte periodontal crítico (Bronzato et al., 2021; Hajishengallis et al., 2012; Lam et al., 2014).

Los LPS de *P. endodontalis* y *P. gingivalis* se asocian a respuestas proinflamatorias y osteolíticas en diferentes estudios (Ahmad-Nejad et al., 2002; Cavalla et al., 2021; Jia et al., 2019; Mirucki et al., 2014; Tang et al., 2011). Las concentraciones de LPS han demostrado una relación directa con el tamaño de las ALEO en PA y se relacionan directamente con la etiopatogenia y el tipo de respuesta inflamatoria del hospedero (Wang et al., 2010). Se ha descrito que PA con ALEOs clínicamente sintomáticas se asocia a mayores concentraciones de LPS (Horiba et al., 1991).

El ADN de *P. gingivalis* se ha descrito como inductor de la producción de citoquinas proinflamatorias al activar células de la inmunidad innata, en particular monocitos humanos (Sahingur et al., 2010). Se ha evidenciado que la respuesta inmunitaria del hospedero al ADN bacteriano (ADNb) muestra variaciones dependiendo de la especie, así como del tipo de célula que se investigue (Dalpke et al., 2006; Sahingur et al., 2011). **El efecto patogénico específico de LPS de *P. endodontalis* ha sido escasamente estudiado mientras que los efectos inmunológicos de su ADN no se han reportado. Sumado a lo anterior y debido a la exposición de los diferentes componentes bacterianos del SCR infectado, es importante investigar el efecto del ADN de *P. endodontalis*.**

II.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 destrucción de los tejidos apicales. Los macrófagos residentes son a menudo la primera célula inmune en entrar en contacto con los microorganismos y son por lo tanto claves en la respuesta frente a los patógenos. La activación de los macrófagos da como resultado una variedad de funciones, tales como la fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno, citoquinas, metaloproteinasas de matriz, y la activación de respuestas celulares y humorales (Dezerega et al., 2012; Lam et al., 2014; Papadopoulos et al., 2013; Sima & Glogauer, 2013). Más aún, la progresión de las lesiones periapicales y la persistencia de la destrucción de los tejidos periodontales

están asociadas a la respuesta proinflamatoria mediada por los macrófagos (Cavalla et al., 2021; Jia et al., 2019). La activación de éstos se desencadena a través de los TLRs mediante el reconocimiento de los PAMPs liberados por las bacterias Gram negativo tales como LPS y ADN (Bronzato et al., 2021; De Nardo et al., 2009; Papadopoulos et al., 2013; Vadillo & Pelayo, 2012).

Se ha establecido que la infección por otra bacteria del género *Porphyromonas*, *P. gingivalis*, induce una infiltración de macrófagos proinflamatorios en los tejidos gingivales y resorción del hueso alveolar (Lam et al., 2014). Sin embargo, existe escasa literatura sobre el papel de los macrófagos en la inmunopatología de la PA y su respuesta frente a los factores de virulencia de *P. endodontalis*. El LPS de *P. gingivalis* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de activar simultáneamente los receptores transmembrana TLR-4 y TLR-2 (Coats et al., 2009; Jia et al., 2019; Liu et al., 2008). Se ha evidenciado una expresión aumentada de TLR-2 en macrófagos humanos en pacientes con PA sintomática en comparación a las asintomáticas, no así de TLR-4 (Desai et al., 2011; Martin et al., 2001). Por otro lado, existe información preliminar que establece que los LPS de *P. endodontalis* actuarían de igual forma sobre TLR-4 como TLR-2 en osteoblastos de ratón promoviendo la expresión de RANKL, sin embargo, estos antecedentes requieren mayor estudio (Tang et al., 2011).

El ADNb es reconocido por TLR-9, receptor presente en la membrana endosomal que se caracteriza por reconocer el patrón Citosina-fosfato-Guanosina (CpG) en el ADNb (Kajita et al., 2007). TLR-9 se considera como el principal receptor en las respuestas inmunitarias frente a ADNb (Ilustración 1) (Holla et al., 2010; Sahingur et al., 2010; Sahingur et al., 2011; Sahingur et al., 2012). La activación de TLR-9 por el ADNb difiere según cada especie bacteriana, y esto depende del número de repeticiones de los dinucleótidos Citosina-Guanina [CG] no metilados presentes en el genoma bacteriano (Dalpke et al., 2006; Gilkeson et al., 1998) y requiere de la endocitosis de CpG y posterior transporte al compartimiento endosomal/lisosomal, donde la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 8 (MyD88) se recluta por el ectodominio de TLR-9 para dar inicio a la transducción de señales (Ahmad-Nejad et al., 2002; Ewald et al., 2008; Herrero, 2010).

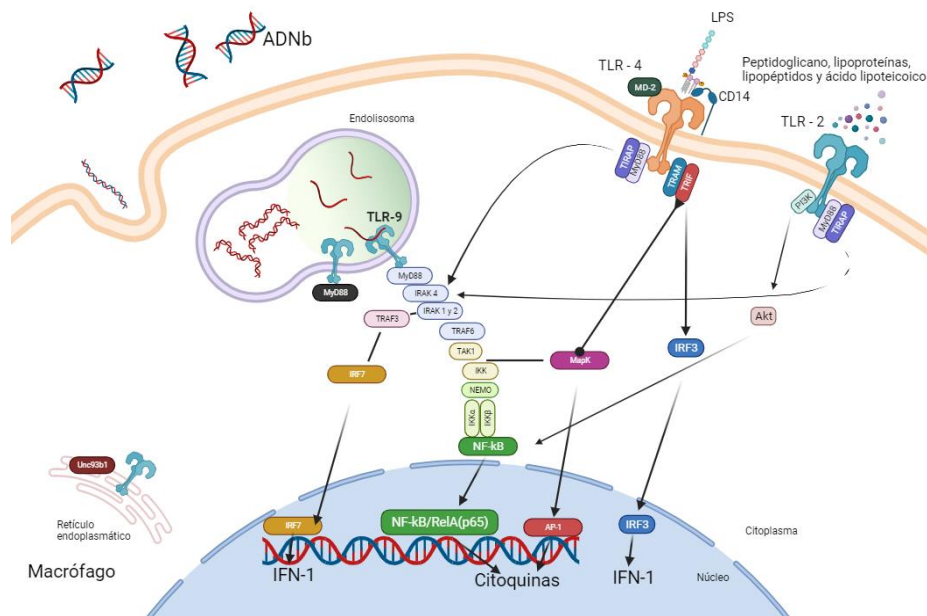


Ilustración 1. Señalización intracelular a partir de la activación de TLR-9, 4 y 2 por PAMPs bacterianos. Se muestran las cascadas transduccionales activadas a partir de la exposición de macrófagos a LPS y ADN. Elaboración propia. (Arancibia et al., 2007; Chan et al., 2015; De Nardo et al., 2009; Dorrington & Fraser, 2019; Herrero, 2010; Trinh et al., 2020).

Se ha descrito que para iniciar la señalización vía TLR-9 se requiere fragmentación de su ectodominio en el entorno degradativo de los endosomas maduros. Esta fragmentación es medida por catepsinas B, K y S y requiere una acidificación endolisosomal (Ewald et al., 2008; Matsumoto et al., 2008; Peer et al., 2008). La fragmentación de TLR-9 se estima que sucede en el interior de la repetición rica en leucina dejando aproximadamente mitad del ectodominio, sugiriendo que adopta una forma de herradura, la cual se encuentra en diferentes tipos de macrófagos y células dendríticas, indicando que es un evento de procesamiento común a diferentes tipos de células inmunes (Ewald et al., 2008; Matsumoto et al., 2008). Se ha descrito que la mayor parte de TLR-9, si no todo, reside en el retículo endoplasmático de las células en reposo. La regulación de la salida de TLR-9 desde el retículo

endoplasmático hacia los endolisosomas está mediada por la proteína Unc93b1 que reside en el retículo endoplasmático. Si bien, el ligando es capaz de unirse a TLR-9 fragmentado y no fragmentado, se evidencia que solo TLR-9 fragmentado es capaz de reclutar a MyD88 y así dar inicio a la transducción de señales proinflamatorias (Ewald et al., 2008; Kashuba et al., 2002; Vadillo & Pelayo, 2012).

Tanto la ligación de LPS como ADNb por TLR-9, -2 y -4 desencadenan la expresión de genes proinflamatorios mediante la activación de varias vías de señalización intracelulares, entre las que NF- κ B desempeña un papel central como *master switch* de la inflamación (Hirschfeld et al., 2001; Tang et al., 2011). El complejo I κ B quinasas (IKK) induce la activación de NF- κ B a través de la fosforilación de I κ B α (una de las dos quinasas que forma el complejo IKK) en un residuo de serina, seguida de su degradación por proteasoma, permitiendo la translocación nuclear de NF- κ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (Arancibia et al., 2007; O'Mahony et al., 2000).

Se ha evidenciado que la estimulación de monocitos THP-1 con ADN de *P. gingivalis* induce concentraciones significativamente elevadas de citoquinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 y IL-8 en comparación con células no estimuladas. Además, la estimulación con ADNb de diferentes bacterias provoca respuestas inflamatorias distintas en macrófagos THP-1 (Cervantes et al., 2019; Sahingur et al., 2012). Más aún, es posible que TLR-9 se comunique con otros receptores y vías de señalización en el curso de la inflamación periodontal. Estudios previos señalan que la señalización de TLR-9 interviene en la pérdida ósea periodontal (Kim et al., 2015). En el mismo estudio se describió menor expresión de IL-17 e IL-23 en ratones nulos para TLR-9 (TLR-9^{-/-}), además de una disminución significativa de IL-6 y TNF- α en células TLR-9^{-/-} tratadas con agonistas TLR-2 y 4 en comparación a las células control. Además, ratones TLR-9^{-/-} fueron completamente resistentes a la pérdida ósea inducida por *P. gingivalis*. Se ha sugerido que la estimulación de macrófagos de ratón con LPS de *Escherichia coli* regula al alza la expresión génica de TLR-9 a través de la vía de señalización NF- κ B (An et al., 2002).

Estos resultados sugieren que TLR-9 posiblemente interactúa con la respuesta de macrófagos mediada por TLR-2 y 4, y amplificaría la respuesta a través de vías de señalización río abajo. **El efecto del ADN de *P. endodontalis* en macrófagos no se ha reportado. Sumado a lo anterior, es importante investigar el efecto de la activación de TLR-9 con ADN de *P. endodontalis* y una posible relación de sinergia con TLR-2 y TLR-4 al estimular macrófagos THP-1.**

La respuesta inmunitaria mediada por macrófagos es central en el desarrollo, progresión y manifestaciones de las PA y podría diferir en respuesta al ADN de *P. endodontalis* a través de su ligación con TLR-9. En consecuencia, es importante evaluar el papel del ADN de *P. endodontalis* y su rol en la respuesta mediada por macrófagos la cual aún no ha sido evaluada. Estos resultados contribuirán a comprender el papel de ADNb en la respuesta inflamatoria y el alcance de la comunicación entre TLR-9, TLR-2 y TLR-4 al estimular con ADN de *P. endodontalis*. La modulación de estos TLRs podría entregar nuevos enfoques en la comprensión y tratamiento de las PA.

II.4. Hipótesis:

El ADN de *P. endodontalis* induce una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-9 en macrófagos humanos.

II.5. Objetivo principal:

Evaluar *in vitro* si el ADN de *P. endodontalis* induce una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-9 en macrófagos humanos.

II.6. Objetivos específicos:

1.6.1 Determinar la expresión génica de citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y IL-10 por estimulación con ADN de *P. endodontalis*.

1.6.2 Evaluar la activación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*.

II.2 METODOLOGIA

II.2.1 Diseño de estudio:

En este estudio experimental *in vitro*, se estimularon macrófagos diferenciados de células THP-1 ECACC® 88081201 (UK Health Security Agency, UK, Londres) con ADN de *P. endodontalis*, obtenido de la cepa de referencia ATCC® 35406™ (ATCC, USA, Manassas) y un aislado clínico endodóntico (4Ecol7) obtenido previamente de canal radicular de paciente con diagnóstico de PAA, almacenado en el banco de muestras del Laboratorio de Microbiología e Inmunología Oral, según criterios clínicos establecidos previamente (Bordagaray et al., 2021).

II.2.2 Purificación de ADN bacteriano:

Se purificó ADN bacteriano a partir de la cepa de referencia de *P. endodontalis* ATCC 35406 y del aislado clínico *P. endodontalis* 4Ecol7. El aislado clínico *P. endodontalis* 4Ecol7 fue obtenido a partir de exudado endodóntico de paciente con PA e identificado por técnicas microbiológicas. Una vez obtenidos los cultivos puros, se verificó que correspondiera a *P. endodontalis* por amplificación del gen 16S rRNA utilizando partidores universales y posterior secuenciación Sanger del amplicón obtenido (Astorga et al., 2022). En ambos casos, *P. endodontalis* ATCC 35406 y 4ecol7, se obtuvieron cultivos puros a partir de los *stocks* del laboratorio previamente confirmados por secuenciación, justo antes de la extracción del ADN. El cultivo de *P. endodontalis* fue realizado en jarra de anaerobiosis con bolsas de generación de atmósfera libre de oxígeno (AnaeroGen™ Thermo scientific, UK, Basingstoke) en placas de agar sangre suplementado con hemina-menadiona (5 µg/mL) por 4-7 días. Las bacterias se subcultivaron en caldo infusión de cerebro-corazón (BHI) suplementado con hemina-menadiona (5 µg/mL) hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) entre 0,6 y 0,8, correspondiente a fase exponencial tardía. Una vez obtenidos los cultivos, se generaron alícuotas en 15 ml, las cuales fueron centrifugadas para luego almacenar los *pellets* a -80°C hasta su procesamiento. A partir de los pellets

bacterianos se purificó ADN por extracción con TRIzol™ (Invitrogen, USA, Carlsband) y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se confirmó la concentración y calidad del ADN (relación de absorbancia 260/280) en un espectrofotómetro (Synergy™, Biotek, USA, Santa Clara). Se descartó la presencia de proteínas en el ADN purificado mediante el ensayo de Bradford y se confirmó la integridad del ADN por, electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con GelRed™ (Biotium, USA, San Francisco). Adicionalmente se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (Tris SDS-PAGE) teñidos con plata para descartar contaminación con LPS (Marolda et al., 2006; Tsai & Frasch, 1982). Finalmente, se efectuó ensayo de Purpald e que determina los niveles de Ácido 3-desoxi-D-manno-oct-2-ulosónico (KDO), componente del core del LPS (Marolda et al., 2006) para confirmar la ausencia de contaminación con LPS. Como controles positivos, se utilizaron LPS de *E. coli* O111:B4 (Thermo scientific, UK, Basingstoke) y lisado de *P. gingivalis* ATCC 33277.

II.2.3 Diferenciación de macrófagos a partir de células THP-1:

Se sembraron 2×10^5 células THP-1 (ECACC® 88081201) por pocillo en placas de 24 pocillos y se diferenciaron a macrófagos con 10 nM de forbol 12-miristato 13- acetato (PMA [Abcam, UK, Cambridge]) por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ en medio RPMI (Corning, USA, Nueva York) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Thermo Fisher, USA Waltham). Las células no adheridas se removieron y las adherentes se lavaron e incubaron por 24 horas en medio RPMI con FBS 10%. (Veloso et al., 2022).

II.2.4 Expresión génica de citoquinas inflamatorias por ADN de *P. endodontalis*:

La expresión génica de citoquinas inflamatorias se evaluó en macrófagos THP-1 estimulados con 100 µg ml⁻¹ de ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406) y aislado clínico por 1 hora (Dalpke et al., 2006; Sahingur et al., 2010; Sahingur et al., 2012). Como control negativo se utilizaron células expuestas a medio sin ADNb.

Para determinar los niveles de expresión génica de las citoquinas de interés, se realizó extracción total de mRNA a partir de las células utilizando TRIzol™ (Invitrogen, USA, Carlsband). El mRNA fue tratado con DNAsa con el kit DNA-free™, Dnase Treatment & Removal (Invitrogen, USA, Carlsband). La concentración de mRNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek, USA, Santa Clara).

El cDNA se sintetizó a partir del mRNA obtenido usando el kit de transcriptasa reversa High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo scientific, UK, Basingstoke). Para cuantificar la expresión de mRNA de las citoquinas de interés, el cDNA se amplificó mediante qPCR StepOnePlus® (Applied Biosystems, Singapur), usando los partidores en la tabla 1(Anexo) y el reactivo KAPA SYBR® Fast (KAPA Biosystems, USA Woburn) de la siguiente manera: 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Para detectar la formación de productos inespecíficos y la amplificación de falsos positivos, se realizó una curva de melting de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos (Veloso et al., 2022). Los niveles de mRNA se calcularon con el método relativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se normalizaron respecto a los niveles de 18S rRNA. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis según la distribución de los datos.

Tabla 1: Partidores para q-PCR:

Blanco*	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TLR-4	5-CCCTCCCCTGTACCCTTC-3	5-TCCCTGCCTTGAATACCTTC-3
18S	5-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3	5-CGTCCACCACTAAGAACG-3

IL-1 β	5-AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG-3	5-TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3
IL-6	5-GCCCAGCTATGAACTCCTTCT-3	5-GAAGGCAGCAGGCAACAC-3
IL-12p35	5-CACTCCCAAAACCTGCTGAG-3	5- TCTCTTCAGAAGTGCAAGGGTA-3
TNF- α	5-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3	5-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3
IL-10	5-TGGGGGAGAACCTGAAGAC-3	5-CCTTGCTCTTGTTTTTCACAGG-3
TLR-9	5-TGTGAAGCATCCTTCCCTGTA-3	5-GAGAGACAGCGGGTGCAG-3
TLR-2	5-CTCTCGGTGTCGGAATGTC-3	5-AGGATCAGCAGGAACAGAGC-3

II.2.5 Participación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*:

La participación de TLR-9 se evaluó en los macrófagos diferenciados de células THP-1 mediante el uso de un inhibidor específico de TLR-9 ODN INH-18, 1 μ M (InvivoGen, USA, San Diego) (Lenert et al., 2009). Éste corresponde a un oligonucleótido sintético que contiene un patrón de ADN inhibidor formado por dos triplete de nucleótidos, un CCT proximal y un GGG más distal, espaciados entre sí por cuatro nucleótidos (Lenert et al., 2009; Lenert, 2010). Como control positivo se utilizó el agonista TLR-9 ODN 2006 2,5 μ M, un oligonucleótido sintético (InvivoGen, USA, San Diego). El ODN 2006 es un oligonucleótido clase B que contiene un esqueleto completo de fosforotioato con uno o más dinucleótidos CpG que activan TLR-9 (Bauer et al., 2001; Krieg et al., 1995; Krug et al., 2001; Marshall et al., 2005).

2.5.1. Transcripción de TLR-9 inducida por ADN de *P. endodontalis*:

Para determinar los niveles de expresión génica de TLR-9, macrófagos diferenciados de células THP-1 fueron estimulados con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 μ g ml⁻¹) por 15 minutos

(Sahingur et al., 2010). Como controles negativos se utilizaron células sin estimular expuestas a medio sin ADN_b; y células estimuladas con ADN de *P. endodontalis* preincubadas por 30 minutos con el inhibidor ODN INH-18 1 μ M. Como control positivo se utilizó como el agonista TLR-9 ODN 2006. Cada experimento se realizó 3 veces y en triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni.

2.5.2. Activación de la vía NF-kB por ADN de *P. endodontalis*:

Se evaluó la activación de la vía de señalización NF-kB en macrófagos diferenciados de células THP-1 estimulados con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 μ g ml⁻¹) y aislado clínico (100 μ g ml⁻¹) por 15 minutos. Como controles negativos se utilizaron células sin estimular expuestas a medio sin ADN_b; y células estimuladas con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 μ g ml⁻¹) y aislado clínico (100 μ g ml⁻¹) preincubadas por 30 minutos con el inhibidor TLR-9, ODN INH-18; 1 μ M. Como control positivo se utilizó el agonista TLR-9, ODN 2006 a 2,5 μ M (InvivoGen, USA, San Diego).

La activación de la vía NF-kB se evaluó mediante inmunolocalización nuclear de la subunidad p65 de NF-kB a través de inmunofluorescencia, e inmunodetección de la subunidad p65 fosforilada mediante Immunowestern blot, como se describe a continuación:

2.5.2.1. Inmunofluorescencia:

Los macrófagos diferenciados sobre cubreobjetos de vidrio fueron expuestos a las condiciones descritas en el punto 2.5.2. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS y permeabilizados con TritónTM X-100 al 0,1% por 15 minutos. Nuevamente se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% por 30 minutos (Reyes et al., 2019). Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-p65, en dilución 1:200 (Cell Signaling, USA, Massachusetts), y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Luego las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 60 minutos a 37°C con anticuerpo secundario policlonal, IgG anti-conejo de cabra

conjugado con AlexaFluor™ 488, 1:200 (Invivogen, USA, San Diego). Finalmente, las células se lavaron con PBS, los núcleos fueron teñidos con colorante Hoechst durante 10 minutos, y se lavaron con PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montaje Dako (Dako, USA).

Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal C2 Plus (Nikon, Japón, Tokio) (Reyes et al, 2019). La fluorescencia para Hoechst (excitación 350 nm, emisión máxima 461 nm) y AlexaFluor™ (máxima excitación y emisión 499 y 520 nm, respectivamente) se capturó mediante adquisición secuencial para obtener archivos de imagen independientes para cada una. Para evitar el sesgo por la tinción de NF-κB, se seleccionaron 100 núcleos por campo. Cada campo se seleccionó observando únicamente la tinción nuclear (Hoechst), se identificaron las células casi confluentes y maximizar así el número de células incluidas en análisis (Noursadeghi et al., 2008). El análisis de las imágenes se realizó con el programa Fiji (<http://fiji.sc>). Se registró el porcentaje de células positivas que expresaron NF-κB nuclear en macrófagos. Cada experimento se realizó 3 veces y en triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni.

2.5.2.2. Inmuno western blot:

Se realizó la extracción de proteínas desde las células con un ensayo comercial de purificación de RNA/Proteínas (Norgen, Canadá, Thorold). La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método colorimétrico de Bradford. Después de cuantificar las muestras, se les adicionó tampón Laemmli y se incubaron durante 10 min a 100°C en placa calefactora. Posteriormente, se cargaron 60 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturantes y reductoras (SDS-PAGE) (Ashikawa et al., 2002). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con BSA 1 % y luego incubadas con anticuerpos. Los anticuerpos primarios anti fosfo p65 de conejo (Cell Signaling, USA, Massachusetts) y anti β-Actina (C4) de ratón (Santa Cruz, USA, Dallas) fueron detectados con anticuerpos secundarios anti- conejo IgG (Santa Cruz, USA, Dallas) y anti- ratón IgG (Bio-Rad, USA, Hércules),

respectivamente conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), utilizando el sistema de quimioluminiscencia EZ-ECL. Las imágenes se capturaron con un fotodocumentador Aplegen Omega Lum G (GMI, España, Barcelona). El análisis densitométrico de las imágenes se realizó con el programa Fiji (<http://fiji.sc>). Los valores de NF-kB fosforilado se normalizaron con respecto a β -actina. Se realizaron tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni.

3. Participación de TLR-9 sobre la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*:

Los macrófagos diferenciados de células THP-1 fueron estimulados con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y aislado clínico (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) por 1 h. Como controles negativos se utilizaron células sin estimular expuestas a medio sin ADN; células estimuladas con ADN de *P. endodontalis* (ATCC[®] 35406[™], 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y aislado clínico (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) preincubadas por 30 minutos con el inhibidor TLR-9, ODN INH-18 1 μM , y células expuestas solo al inhibidor TLR-9, ODN INH-18 1 μM .

Se determinó la expresión génica de las citoquinas de interés mediante RT q-PCR a partir de mRNA extraído según las condiciones descritas en el punto 2.4. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

4. Participación de TLR-2 y 4 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*:

La participación de TLR-2 y TLR-4 se evaluó, en primera instancia, mediante la determinación de los niveles de transcripción génica de estos receptores; y, en segundo lugar, mediante la expresión génica de las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y IL-10 e inhibición conjunta de TLR-2 y 4, usando el inhibidor comercial OxPAPC (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Erridge et al., 2008; Sahingur et al., 2010). OxPAPC es una mezcla de fosfolípidos oxidados que contienen residuos sn-2 fragmentados u oxigenados de longitud completa. Estos inhiben la señalización inducida por lipopéptidos y

lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, compitiendo con la proteína de unión a LPS (LBP), CD14 y la proteína de diferenciación mieloide 2 (MD-2), las proteínas accesorias que interactúan con los lípidos bacterianos, bloqueando así la señalización de TLR-2 y TLR-4 (Chu et al., 2018; Erridge et al., 2008; Stamenkovic et al., 2019; Von Schlieffen et al., 2009).

4.1 Transcripción de TLR-2 y 4 frente a ADN de *P. endodontalis*:

Para evaluar la potencial participación de TLR-2 y TLR-4 en la respuesta inducida por ADN de *P. endodontalis* se determinó la expresión génica de TLR-2 y 4 en macrófagos diferenciados de células THP-1 estimulados con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) por 15 minutos (Sahingur et al., 2010). Como controles negativos se utilizaron células sin ADNb y células estimuladas con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y aislado clínico (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) preincubadas por 30 minutos con el inhibidor OxPAPC, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Erridge et al., 2008). Como control positivo se utilizó el agonista TLR-9, ODN 2006 a 2,5 μM (InvivoGen, USA, San Diego).

Se determinó la expresión génica mediante RT q-PCR a partir de mRNA extraído según las condiciones descritas en el punto 2.4. Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni.

4.2 Participación de TLR-2 y 4 sobre el efecto del ADN de *P. endodontalis* sobre la expresión génica de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12 TNF- α e IL-10:

Los macrófagos fueron estimulados con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y aislado clínico (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) por 1 hora (Dalpke et al., 2006; Sahingur et al., 2010; Sahingur et al., 2012). Como controles negativos se utilizaron células expuestas a medio sin ADNb, y células preincubadas por 30 minutos con el inhibidor OxPAPC, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (InvivoGen, USA, San Diego) estimuladas con ADN de *P. endodontalis* (ATCC 35406, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y aislado clínico (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Se determinó la expresión génica de las citoquinas de interés mediante RT q-PCR a partir de mRNA extraído según las condiciones descritas en el punto 2.4. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno triplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

III. RESULTADOS

III.1. El ADN de *P. endodontalis* induce la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.

Se confirmó la pureza del DNA de *P. endodontalis* purificado en este trabajo (Tabla suplementaria 1 y figura suplementaria 1 y 2) y se determinó la concentración de estimulación de macrófagos diferenciados de células THP-1 (Figura suplementaria 3 y 4).

El ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 indujo un aumento significativo de los niveles de mRNA de TNF- α e IL-1 β por encima del control sin estimular (Figura 1 A y B; $p < 0,05$); pero no así de IL-6, IL-12 e IL-10 (Figura 1 A-E; $p > 0,05$). El ADN de *P. endodontalis* aislado clínico indujo un aumento significativo de los niveles de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IL-10 por encima del control sin estímulo ($p < 0,05$), y también indujo mayores niveles de mRNA de IL-1 β , IL-6 y IL-10 respecto de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (Figura 1 A-E; $p < 0,05$).

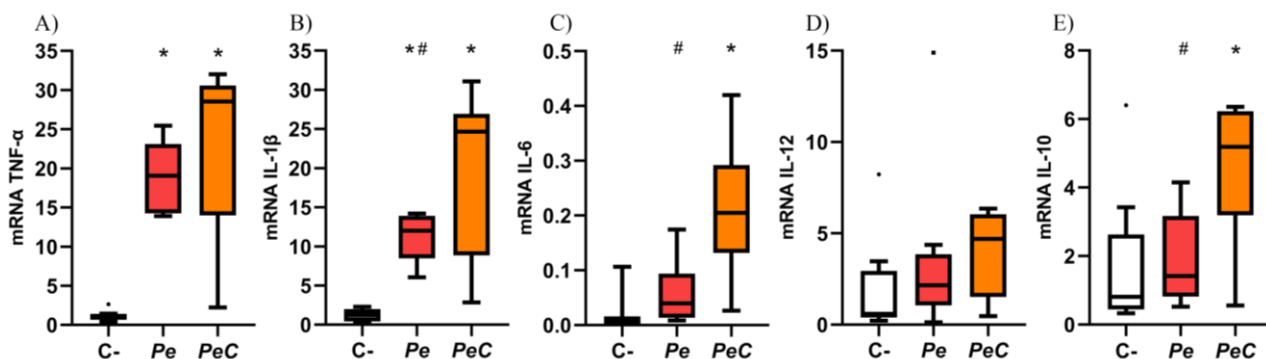


Figura 1. Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10 en macrófagos *in vitro* estimulados con ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y aislado clínico. Las células fueron estimuladas por 1 hora con 100 μ g/ml de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (Pe) o aislado clínico (PeC). La expresión génica relativa fue normalizada en relación con rRNA 18S y expresada como la diferencia entre $2^{-\Delta\Delta C_t}$

$\Delta\Delta CT$. Se realizaron 3 experimentos independientes y cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA (A y B) o Kruskal-Wallis (C, D y E). C-, macrófagos sin estimular. * $p < 0,05$, respecto del control negativo; # $p < 0,05$, respecto de *PeC*.

III.2. Participación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*.

III.2.1. El ADN de *P. endodontalis* no indujo cambios en los niveles de mRNA de TLR-9.

Se confirmó la concentración de estimulación con agonista e inhibidor de TLR-9 en macrófagos diferenciados de células THP-1 (Figura suplementaria 3 y 4).

Los ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y aislado clínico no indujeron cambios en los niveles de mRNA de TLR-9 respecto al control sin estimular ($p < 0,05$); el ADN de *P. endodontalis* aislado clínico mostró una tendencia a aumentar la expresión de mRNA de TLR-9, sin embargo, no fue estadísticamente significativa (Figura 2; $p > 0,05$).

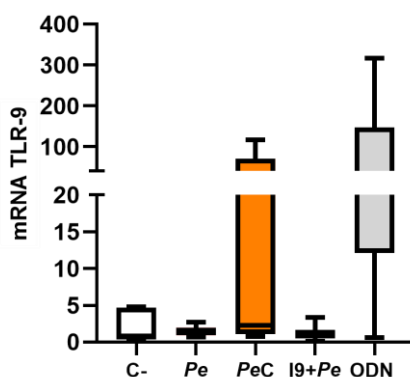


Figura 2. Expresión de TLR-9 en macrófagos *in vitro* estimulados con ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y *P. endodontalis* aislado clínico. Las células fueron estimuladas por 15 minutos con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (*Pe*) o aislado clínico (*PeC*) por separado. Además, fueron tratados con agonista de TLR-9 (ODN 2006; 2,5 μM) como control positivo y previamente tratados por 30 minutos con inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18; 1 μM) más ADN de *P.*

endodontalis ATCC 35406 como control negativo. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con rRNA 18S y expresado como la diferencia entre $2^{\Delta\Delta CT}$. Se realizaron 3 experimentos independientes y cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni. C-, macrófagos sin estimular. I9, ODN INH-18. ODN, ODN 2006.

III.2.2. El ADN de *P. endodontalis* induce la activación de NF-kB vía TLR-9.

El ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 indujo la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF-kB (Figura 3 A) y la fosforilación de p65 (Figura 3 C). El análisis cuantitativo confirmó que el ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 indujo un aumento significativo del porcentaje de células con localización nuclear de p65 (Figura 3 A-B; $p < 0,05$). De modo similar, los macrófagos estimulados con ADN de aislado clínico evidenciaron un aumento significativo del porcentaje de células p65 en comparación con el grupo sin estimular (Figura 3 B; $p < 0,05$). Por su parte, el inhibidor de TLR-9 indujo una reducción de la localización nuclear de p65 respecto de *P. endodontalis* ATCC 35406 y aislado clínico (Figura 3 A-B; $p < 0,05$).

También, se observó un mayor porcentaje de macrófagos positivos que expresaron NF-kB nuclear en las células estimuladas con ADN de *P. endodontalis* aislado clínico, en comparación con las estimuladas con ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (Figura 3 A y B; $p < 0,05$).

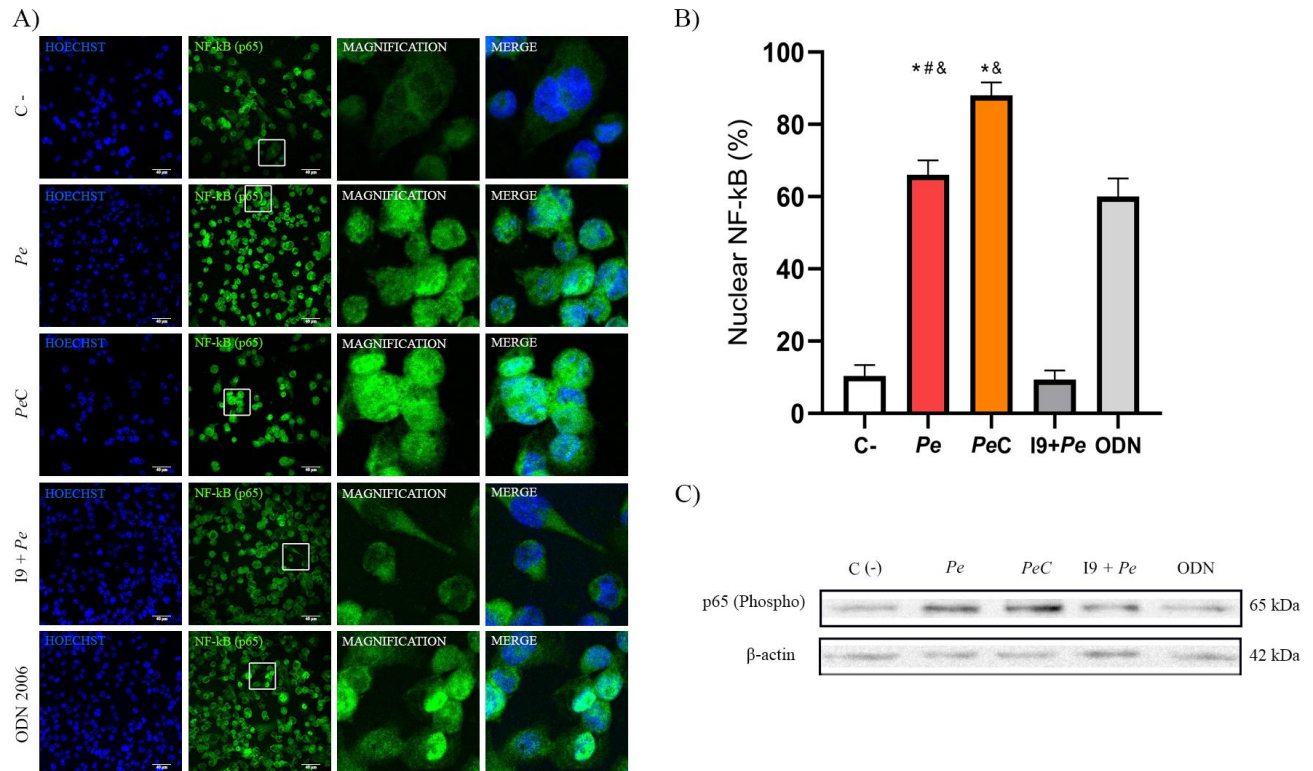


Figura 3. Translocación nuclear de NF- κ B en macrófagos *in vitro* estimulados ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y *P. endodontalis* aislado clínico. Los macrófagos fueron estimulados por 15 minutos con 100 μ g/ml de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (*Pe*) o ADN de *P. endodontalis* aislado clínico (*PeC*) por separado. Además, fueron tratados con agonista de TLR-9 (ODN 2006; 2,5 μ M) como control positivo y tratados previamente por 30 minutos con inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18; 1 μ M) más ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 como control negativo. Las células se trataron con anticuerpo anti-NF- κ B y se determinó su translocación al núcleo mediante inmunofluorescencia en microscopio confocal (A y B); y la activación de NF- κ B mediante determinación de la fosforilación de la subunidad p65 (Rel A) a través de Inmuno Western Blot, imagen representativa (C). Se realizaron 3 experimentos independientes y cada uno en triplicado para la inmunofluorescencia y 3 experimentos independientes para Inmuno Western Blot. En B gráficos de barra representa el promedio y desviación estándar. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de

Bonferroni. C-, macrófagos sin estimular. I9, ODN INH-18. ODN, ODN 2006. * $p < 0,05$, con respecto a C-; # $p < 0,05$, respecto de *PeC*; & $p < 0,05$, con respecto a I9 + *Pe*.

III.2.3. TLR-9 participa en la expresión génica de IL-6 por ADN de *P. endodontalis*, aislado clínico.

El ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 indujo un aumento de los niveles de mRNA de TNF- α e IL-6 por encima del control sin estimular (Figura 4 A-E; $p < 0,05$), mientras que no se observaron cambios significativos al inhibir TLR-9 ($p > 0,05$). Además, se confirmó que el inhibidor de TLR-9 no indujo efectos en células no estimuladas con ADN (Figura 4 A-J; $p > 0,05$).

El ADN de *P. endodontalis* aislado clínico indujo un aumento de los niveles de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por encima del control sin estimular ($p < 0,05$), mientras que la inhibición de TLR-9 en células estimuladas con ADN de ATCC 35406 y *P. endodontalis* aislado clínico indujo una disminución significativa en la expresión génica de IL-6 (Figura 4 C y H; $p < 0,05$).

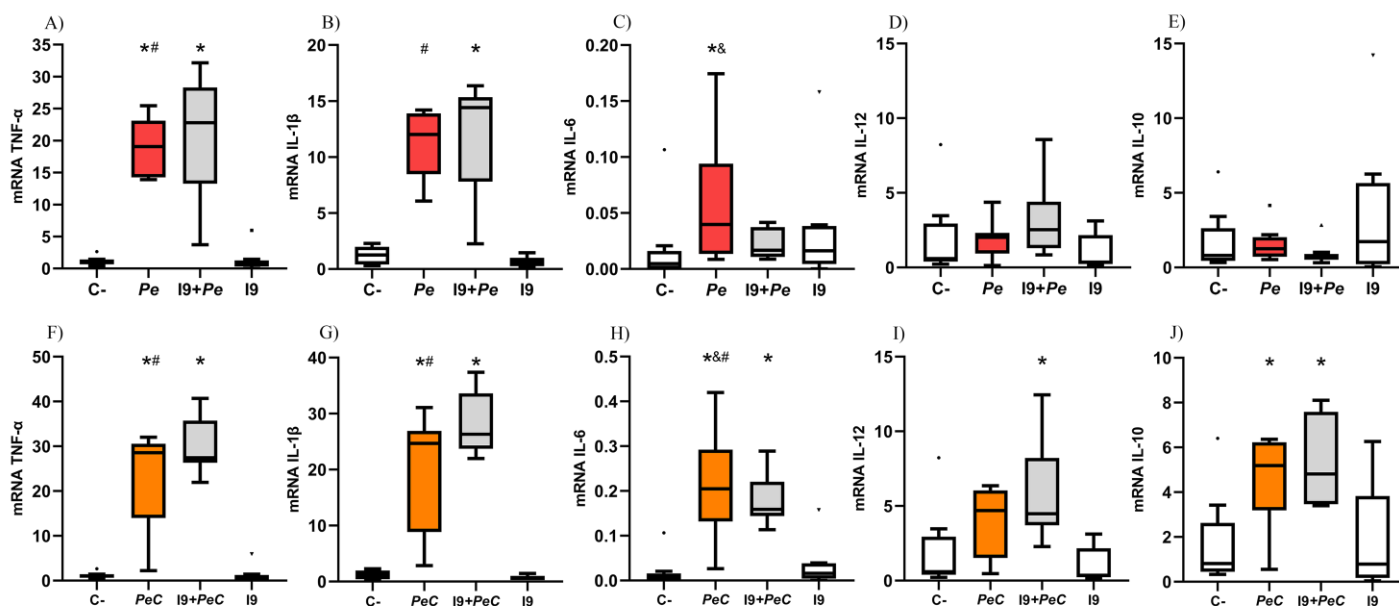


Figura 4. Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y IL-10 en macrófagos *in vitro* estimulados con ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406, aislado clínico y tratados con inhibidor de TLR-9. Las células fueron estimuladas por 1 hora con 100 μ g/ml de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (*Pe*) o *P. endodontalis* aislado clínico (*PeC*). Además, fueron tratados por 30 minutos con inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18; 1 μ M) más ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con rRNA 18S y expresado como la diferencia entre $2^{\Delta\Delta CT}$. Se realizaron 3 experimentos independientes y cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de Kruskal Wallis. C-, macrófagos sin estimular. I9, ODN INH-18. * $p < 0,05$ con respecto del control negativo. & $p < 0,05$ con respecto de I9 + *Pe* o *PeC*, # $p < 0,05$ con respecto a I9.

IV.3. Participación de TLR-2 y 4 en la respuesta inducida por ADN de *P. endodontalis*.

IV.3.1. El ADN de *P. endodontalis* no indujo cambios en los niveles de mRNA de TLR-2 y 4.

Ni el ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 ni el de su aislado clínico indujeron cambios significativos en los niveles de mRNA de TLR-2 o 4 respecto del control sin estimular ($p < 0,05$); aunque hubo una tendencia hacia un aumento de los niveles de mRNA de TLR-2 al estimular con ADN de *P. endodontalis* aislado clínico respecto del control no estimulado (Figura 5; $p > 0,05$).

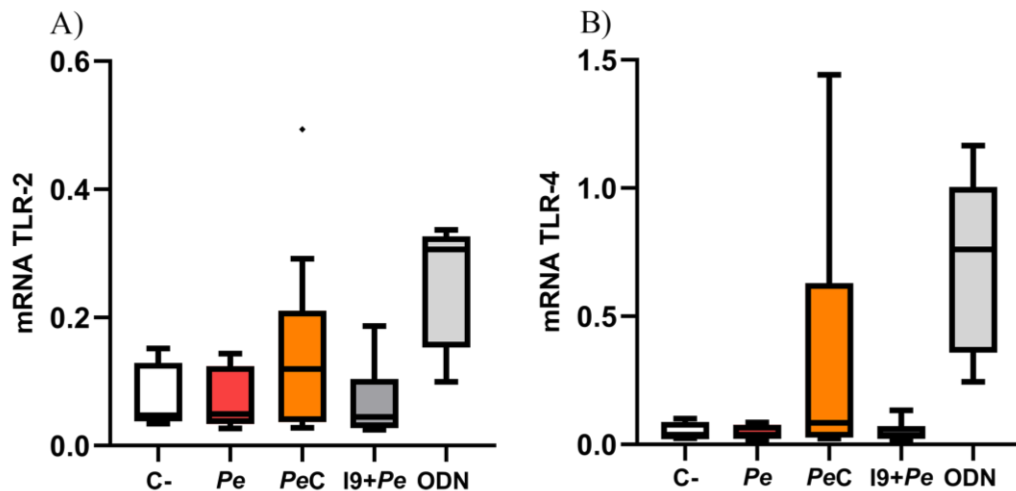


Figura 5. Expresión de TLR-9 en macrófagos estimulados con ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y *P. endodontalis* aislado clínico. Las células fueron estimuladas por 15 minutos con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (*Pe*) o ADN de *P. endodontalis* aislado clínico (*PeC*) por separado. Además, fueron tratados con agonista de TLR-9 (ODN 2006; 2,5 μM) como control positivo y tratados por 30 minutos con inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18; 1 μM) más ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 como control negativo. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con rRNA 18S y expresado como la diferencia entre $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Se realizaron 3 experimentos independientes y cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de ANOVA y post-hoc de Bonferroni. C-, macrófagos sin estimular. I9, ODN INH-18. ODN, ODN 2006.

IV.3.2. TLR-2 y/o 4 participan en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 al estimular con ADN de *P. endodontalis*.

El ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 indujo un aumento significativo de los niveles de TNF- α e IL-6 por encima del control sin estimular, mientras que al inhibir TLR-2 y TLR-4 se observaron reducciones en la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 respecto del grupo estimulado (Figura 6A-E; $p < 0.05$). Además, se confirmó que el inhibidor de TLR-2 y TLR-4 no indujo efectos en células no estimuladas con ADN (Figura 6 A-E).

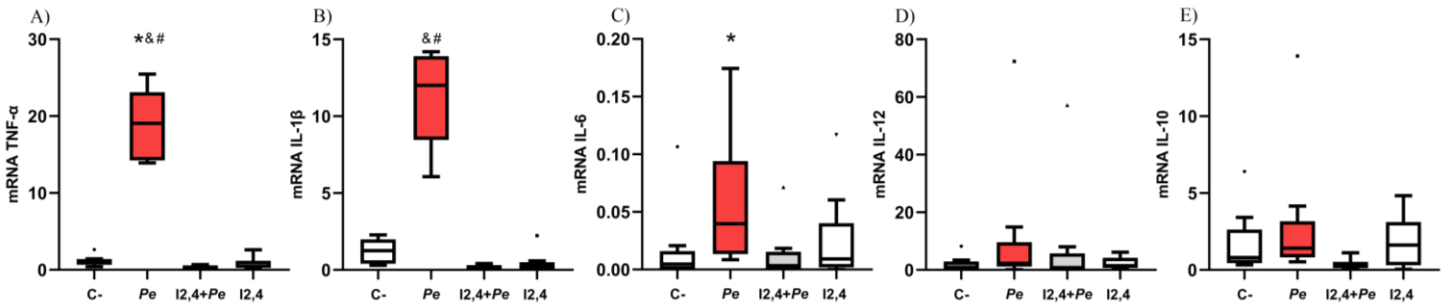


Figura 6. Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y IL-10 en macrófagos *in vitro* estimulados con ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y tratados con inhibidor de TLR 2 y 4. Las células fueron estimuladas por 1 hora con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 (*Pe*). Además, fueron tratadas previamente por 30 minutos con inhibidor de TLR-2 y 4 (OxPAPC; 30 $\mu\text{g/ml}$) más ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406. La expresión génica relativa fue normalizada en relación con rRNA 18S y expresado como la diferencia entre $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Se realizaron 3 experimentos independientes y cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. El análisis estadístico de los resultados se realizó por la prueba de Kruskal Wallis. C-, macrófagos sin estimular. I2,4, OxPAPC. * $p < 0,05$ con respecto a control negativo. & $p < 0,05$ con respecto a I2,4+*Pe*. # $p < 0,05$ con respecto a I2,4.

IV. DISCUSION

Se ha detectado una gran variedad de especies bacterianas, principalmente bacterias anaerobias Gram negativo asociadas a infecciones apicales (Bordagaray et al., 2021; Bronzato et al., 2021; Marchesan et al., 2016; Paster et al., 2006). Entre estas, especies del género *Porphyromonas* son reconocidas como parte de los agentes centrales para el desarrollo y la progresión de la PA (Belstrøm et al., 2014; Colombo et al., 2012; Pérez-Chaparro et al., 2014). En línea con lo anterior, se ha descrito que el ADN bacteriano puede tener efectos sobre las células inmunes (Bordagaray et al., 2021; Jiménez et al., 2022); sin embargo, éste difiere según la especie bacteriana. Hasta el momento se desconoce el efecto del ADN de *P. endodontalis* sobre la respuesta inflamatoria (Bordagaray et al., 2021; Dalpke et al., 2006; Jiménez et al., 2022) y los receptores involucrados. En este estudio evidenciamos por primera vez que el ADN de *P. endodontalis* induce una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-9 y señalización vía NF- κ B, e involucra la participación de TLR-2 y/o 4 en macrófagos humanos. Considerando lo anterior, la presencia del ADN de *P. endodontalis* podría contribuir a explicar los diferentes espectros de severidad de la PA y el tipo de respuesta inflamatoria del hospedero (Bordagaray et al., 2021; Bronzato et al., 2021).

El ADN de *P. endodontalis* induce la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.

En el presente estudio, evidenciamos que el ADN de *P. endodontalis* purificado a partir de la cepa de referencia ATCC 35406 y del aislado clínico indujo aumentos de los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF- α , IL-1 β e IL-6, en macrófagos humanos. De modo similar, se ha evidenciado que la estimulación con ADN de *P. gingivalis* de monocitos y macrófagos de THP-1 induce concentraciones significativamente elevadas de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 y IL-8, y antiinflamatorias IL-10, IL-4 y TGF- β , en comparación con células no estimuladas (Blancas-Luciano et al., 2023; Cervantes et al., 2019; Lin et al., 2022; Sahingur et al.,

2010; Sahingur et al., 2012). Los macrófagos son una población celular con amplia plasticidad y dinámica de diferenciación (Sima & Glogauer, 2013). Estos perfiles de citoquinas proinflamatorias se asocian al perfil M1 de macrófagos, mientras que los macrófagos M2 participan en la regulación inmunitaria y la reparación de tejidos mediante la síntesis de citoquinas inmunomoduladoras. De este modo, el microambiente puede modificar rápidamente el fenotipo funcional de estas células (Veloso et al., 2022). A su vez, los macrófagos M1 promueven las respuestas Th1 y Th17, asociadas con la destrucción de los tejidos periodontales, mientras que los macrófagos M2 interactúan con las respuestas de las células Th2 y Treg, que se consideran protectoras de los tejidos periodontales (Cavalla et al., 2021). En concordancia con lo anterior, se ha reportado un perfil predominantemente M1 en periodontitis apical sintomática en comparación con lesiones apicales asintomáticas y ligamento periodontal sano (Veloso et al., 2022), mientras que la infiltración de macrófagos M1 indujo la destrucción del tejido periodontal en modelo murino de periodontitis inducida por LPS de *P. gingivalis* (Lam et al., 2014). Además de los efectos proinflamatorios y osteorresortivo, IL-6 tiene potentes efectos sistémicos, estimulando la hematopoyesis, el crecimiento y la diferenciación de células T y B, y la reacción de fase aguda en el hígado, estableciendo una relación mecanística entre la respuesta periapical, la inflamación sistémica y el riesgo de enfermedades no transmisibles. Sobre la base de lo anteriormente expuesto, el ADN de *P. endodontalis* se asocia con citoquinas del perfil M1, y por tanto podría potenciar la respuesta proinflamatoria local y sistémica en PA.

El ADN de *P. endodontalis* induce la activación de NF- κ B vía TLR-9.

TLR-9 es un sensor endosomal clave para el reconocimiento de ADNb que se une a motivos CpG de oligodesoxinucleótidos no metilados característicos de células procariontes (Crump y Sahingur, 2016). TLR-9 es el sensor de ácido desoxirribonucleico más sobreexpresado en tejidos gingivales inflamados en periodontitis (Sahingur et al., 2013; Zhan et al., 2014). Sin embargo, el tipo de respuesta inmune depende específicamente de la especie bacteriana (Dalpke et al., 2006; Li et al., 2023). En base a lo anterior, se ha descrito que la estimulación con ADN de *P. gingivalis* en células

THP-1 genera un aumento en la expresión de TLR-9 después de 15 minutos de estimulación, respecto de las células monocíticas humanas sin estimular (Sahingur et al., 2010). De modo similar, se han reportado mayores niveles de expresión génica de TLR-9 en ALEOS en comparación con ligamento periodontal sano (Fernandez et al., 2022; Gravina et al., 2013). En el presente estudio, no identificamos cambios en los niveles de transcritos de TLR-9. Sin embargo, demostramos translocación nuclear de la subunidad p65 de la vía de señalización NF- κ B en respuesta al ADN obtenido tanto de la cepa de referencia de *P. endodontalis* como del aislado clínico, mientras que la inhibición de TLR-9 con un oligonucleótido sintético redujo significativamente la translocación nuclear de p65. Asimismo, estudios previos sostienen la activación de la vía NF- κ B en modelos celulares con monocitos y macrófagos (Mussbacher et al., 2023; Noursadeghi et al., 2008; Stacey et al., 2016), a través del reconocimiento de ADN de *P. gingivalis* y *Tannerella forsythia* por TLR-9 (Sahingur et al., 2010). Esto a su vez induce la producción de TNF- α e IL-6 y secreción de interferón (Chen et al., 2023). Más aún, la activación de TLR-9 es considerada como uno de los factores que promueven el envejecimiento durante la periodontitis, generando un entorno de inflamación y senescencia de células (Albuquerque-Souza et al., 2022).

TLR-9 participa en la expresión génica de IL-6 inducida por ADN de *P. endodontalis*.

En el presente estudio la inhibición de TLR-9 demostró un efecto, aunque limitado, sobre la expresión de citoquinas inducidas por ADN de *P. endodontalis*. En particular, se evidenció la reducción de IL-6 en macrófagos estimulados con ADN de ATCC 35406 y aislado clínico. En línea con lo anterior, la activación de TLR-9 en macrófagos tiene un efecto más pronunciado sobre los niveles de IL-6 que de otras citoquinas (Kim et al., 2015). Se han descrito al menos 14 sensores intracelulares de ADN. Entre éstos, los receptores “Scavenger” son receptores de superficie capaces de censar ADN CpG en macrófagos, sin embargo, su papel sobre la estimulación inmune aún no está claro (Zhu et al., 2001). En línea con anterior, no se detectaron diferencias en la síntesis de IL-12 en macrófagos esplénicos y de médula ósea para receptores scavengers respecto de los silvestres (Zhu et al.,

2001). Por otro lado, el sensor NLRP3 del inflamasoma también puede reconocer ADN_b y su activación induce la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, e induce piroptosis (Man et al., 2016).

TLR-2 y TLR-4 participan en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 inducida por ADN de *P. endodontalis*.

De modo similar a lo descrito para TLR-9, la inhibición simultánea de TLR-2 y TLR-4 redujo los niveles de transcritos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 inducida por DNA de la cepa de referencia de *P. endodontalis*. Esto sugiere la participación de TLR-2 y/o TLR-4 en la respuesta inflamatoria frente al ADN de *P. endodontalis*. Por otro lado, el ADN de *P. endodontalis* no indujo cambios en la expresión de estos receptores. TLR-2 y TLR-4 son receptores transmembrana que clásicamente señalizan en respuesta a lipoproteínas y LPS bacterianos, respectivamente (Coats et al., 2009; Fernandez et al., 2023; Jia et al., 2019; Liu et al., 2008). TLR-4 y TLR-9 actuarían en forma sinérgica en la producción de TNF- α asociada a una mayor señalización dependiente de MyD88 por proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) inducida por LPS y ADN CpG en macrófagos murinos (De Nardo et al., 2009). De modo similar, la interacción entre TLR-2 y TLR-9 determina la producción de citoquinas de la familia IL-12 en microglia estimulada con bacterias Gram positivo (Holley et al., 2012). Sumado a lo anterior, ratones deficientes para TLR-2, TLR-4 o TLR-9 no muestran susceptibilidad, o solo una susceptibilidad menor a la infección por *Micobacterium tuberculosis* en dosis bajas. Estos antecedentes sugieren una participación conjunta de estos receptores en la señalización frente a sus ligandos respectivos (Kim et al., 2015; Saiga et al., 2011). De modo similar, TLR-4 puede ser internalizado y estimular vías intracelulares como receptor endosomal. Se ha propuesto que TLR-2 también activaría NF- κ B desde los endosomas en monocitos humanos, induciendo la producción de IFN tipo I en ratón (Mussbacher et al., 2023; Noursadeghi et al., 2008; Stacey et al., 2016). Por lo tanto, la maquinaria endocítica jugaría un papel fundamental en interacción de estas vías; sin embargo, no se encuentran caracterizadas del todo (Marongiu et al., 2019).

El ADN de *P. endodontalis* aislado clínico indujo un efecto inflamatorio más marcado en comparación con la cepa de referencia ATCC 35406.

Este es el primer estudio en el que se evalúa el efecto inflamatorio del ADN de *P. endodontalis* en macrófagos y se incluye un aislado clínico de canal endodóntico, el cual fue identificado por técnicas microbiológicas y confirmado como *P. endodontalis* mediante secuenciación del gen 16 rRNA (Astorga et al., 2022). En el presente estudio evidenciamos que el ADN de *P. endodontalis* aislado clínico indujo un efecto inflamatorio más marcado en comparación con el ADN obtenido de la cepa de referencia ATCC 35406. En la literatura, ha sido ampliamente descrito que algunos aislados clínicos presentan comportamientos diferentes respecto a cepas de referencia mantenidas en condiciones de laboratorio. Así, se ha reportado que aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* han demostrado mayor resistencia antibiótica en comparación con las cepas de referencia ATCC 9027 y ATCC 6538, respectivamente (Mohammadinia et al., 2012). Sumado a lo anterior, se observó mayor capacidad de adherencia del aislado clínico de *Wolinella recta* asociado a periodontitis, respecto de sus cepa de referencia 33238 lo que sugiere diferencias en sus capacidades de interacción con células del hospedero (Borinski & Holt, 1990; Lai et al., 1992). En línea con lo anterior, se ha reportado mayor capacidad de invasión de los aislados clínicos en comparación con cepa de referencia ATCC 6538 de *S. aureus* en macrófagos (Iqbal et al., 2016). Estos antecedentes demuestran que los aislados clínicos presentan distintas propiedades y estructuras comparados con sus cepas de referencia, lo cual, podría explicarse porque al provenir de individuos con enfermedades activas, podrían estar expresando factores de virulencia más efectivos en la colonización del hospedero. Esto en contraposición con cepas de referencia mantenidas rutinariamente en el laboratorio más atenuadas en cuanto a su virulencia. Apoyando esta idea, se ha reportado que incluso aislados clínicos provenientes de individuos periodontalmente sanos son más atenuadas comparadas con aislados provenientes de pacientes con periodontitis activa (Mendez et al., 2019). En el caso articular de nuestro aislado clínico, se ha reportado que la respuesta inmunitaria gatillada por el ADN depende del número de repeticiones

de los dinucleótidos CG no metilados presentes en el genoma (Dalpke et al., 2006; Gilkeson et al., 1998; Holla et al., 2010; Sahingur et al., 2010; Sahingur et al., 2011; Sahingur et al., 2012). Por lo tanto, el mayor efecto inflamatorio inducido por *P. endodontalis* aislado clínico se podría explicar en parte por la potencial presencia de motivos CpG no metilados en sus genomas.

El efecto proinflamatorio reportado en el presente estudio es relevante clínicamente debido a que el ADN de *P. endodontalis* se encuentra frecuentemente en los canales radiculares y lesiones apicales de dientes con PA (Bordagaray et al., 2021). A su vez, la respuesta inflamatoria de los macrófagos se vincula con la progresión de las lesiones periapicales y la persistencia de la destrucción de los tejidos periodontales (Cavalla et al., 2021; Jia et al., 2019). Por otro lado, el ADN de *P. endodontalis* se ha detectado en células mononucleares periféricas, respaldando su posible papel en la translocación bacteriana sistémica (Bordagaray et al., 2021), mientras que la carga bacteriana sistémica se asocia con la activación de células mononucleares, producción de citoquinas proinflamatorias, la supervivencia prolongada de monocitos circulantes y un mayor riesgo de futuras complicaciones de enfermedades sistémicas no transmisibles (Bordagaray et al., 2021). De este modo, la PA y en particular la infección endodóntica por *P. endodontalis* se asocia con riesgo cardiovascular, sobre la base de los niveles de hsCRP y endotoxemia, mientras que la respuesta inmune humoral mediada por IgG anti-*P. endodontalis* parece ser protectora frente a la inflamación sistémica de bajo grado (Jiménez et al., 2022).

En este estudio se evidencia por primera vez la respuesta inflamatoria de macrófagos frente al ADN de *P. endodontalis* con participación de TLR-9 y la vía NF- κ B, y su potencial papel en la respuesta inflamatoria periapical y sistémica. Además, nuestros resultados sugieren la participación de TLR-2 y/o TLR-4 en macrófagos humanos frente al ADN de *P. endodontalis*. Si bien los análisis de determinación de proteínas, presencia de ácidos nucleicos contaminantes, cuantificación y visualización de LPS, no evidenciaron contaminación del ADN purificado de *P. endodontalis* ATCC 35406, pudimos observar trazas de LPS en el ADN purificado a partir del aislado clínico. Por lo anterior, no podemos excluir por

completo la potencial influencia del LPS sobre la intensidad de la respuesta inflamatoria en el caso de los aislados clínicos.

V. CONCLUSIONES

El ADN de *P. endodontalis* induce una respuesta proinflamatoria mediada por TLR-9 y señalización NF-kB, e involucraría la participación de TLR-2 y/o 4 en macrófagos humanos.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., & Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*, *32*(7), 1958-1968. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200207\)32:7<1958::Aid-immu1958>3.0.Co;2-u](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200207)32:7<1958::Aid-immu1958>3.0.Co;2-u)
- Albuquerque-Souza, E., Crump, K. E., Rattanaprukskul, K., Li, Y., Shelling, B., Xia-Juan, X., Jiang, M., & Sahingur, S. E. (2022). TLR9 Mediates Periodontal Aging by Fostering Senescence and Inflammaging. *J Dent Res*, *101*(13), 1628-1636. <https://doi.org/10.1177/00220345221110108>
- An, H., Xu, H., Yu, Y., Zhang, M., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Qin, Z., & Cao, X. (2002). Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF- κ B, ERK and p38 MAPK signal pathways. *Immunology Letters*, *81*(3), 165-169. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00010-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00010-X)
- Arancibia, S. A., Beltran, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F., & Hermoso, M. A. (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*, *40*(2), 97-112. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602007000200001>
- Ashikawa, K., Majumdar, S., Banerjee, S., Bharti, A. C., Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2002). Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of IkkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation. *J Immunol*, *169*(11), 6490-6497. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6490>
- Astorga, J., Hernandez, M., Bravo, D., & Hoare, A. (2022). Evaluation of PCR primers to identify Porphyromonas endodontalis in apical periodontitis clinical samples. *Arch Microbiol*, *204*(10), 652. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03260-7>
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., & Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(16), 9237-9242. <https://doi.org/10.1073/pnas.161293498>
- Belstrøm, D., Fiehn, N. E., Nielsen, C. H., Kirkby, N., Twetman, S., Klepac-Ceraj, V., Paster, B. J., & Holmstrup, P. (2014). Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *J Clin Periodontol*, *41*(2), 104-112. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12190>

- Blancas-Luciano, B. E., Zamora-Chimal, J., Da Silva-De Rosenzweig, P. G., Ramos-Mares, M., & Fernández-Presas, A. M. (2023). Macrophages immunomodulation induced by *Porphyromonas gingivalis* and oral antimicrobial peptides. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-023-00798-w>
- Bordagaray, M. J., Fernández, A., Garrido, M., Astorga, J., Hoare, A., & Hernández, M. (2021). Systemic and Extraradicular Bacterial Translocation in Apical Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*, *11*, 649925. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.649925>
- Borinski, R., & Holt, S. C. (1990). Surface characteristics of *Wolinella recta* ATCC 33238 and human clinical isolates: correlation of structure with function. *Infect Immun*, *58*(9), 2770-2776. <https://doi.org/10.1128/iai.58.9.2770-2776.1990>
- Bronzato, J. D., Davidian, M. E. S., de Castro, M., de-Jesus-Soares, A., Ferraz, C. C. R., Almeida, J. F. A., Marciano, M. A., & Gomes, B. (2021). Bacteria and virulence factors in periapical lesions associated with teeth following primary and secondary root canal treatment. *Int Endod J*, *54*(5), 660-671. <https://doi.org/10.1111/iej.13457>
- Cavalla, F., Letra, A., Silva, R. M., & Garlet, G. P. (2021). Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*, *100*(1), 29-36. <https://doi.org/10.1177/0022034520952341>
- Cervantes, J. L., Oak, E., Garcia, J., Liu, H., Lorenzini, P. A., Batra, D., Chhabra, A., Salazar, J. C., & Roca, X. (2019). Vitamin D modulates human macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Tuberculosis (Edinb)*, *116s*, S131-s137. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.04.021>
- Chan, M. P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G. N., & Miyake, K. (2015). DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat Commun*, *6*, 5853. <https://doi.org/10.1038/ncomms6853>
- Chen, S., Lei, Q., Zou, X., & Ma, D. (2023). The role and mechanisms of gram-negative bacterial outer membrane vesicles in inflammatory diseases. *Front Immunol*, *14*, 1157813. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1157813>
- Chu, L. H., Indramohan, M., Ratsimandresy, R. A., Gangopadhyay, A., Morris, E. P., Monack, D. M., Dorfleutner, A., & Stehlik, C. (2018). The oxidized phospholipid oxPAPC protects from septic shock by targeting the non-canonical inflammasome in macrophages. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03409-3>
- Coats, S. R., Jones, J. W., Do, C. T., Braham, P. H., Bainbridge, B. W., To, T. T., Goodlett, D. R., Ernst, R. K., & Darveau, R. P. (2009). Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cell Microbiol*, *11*(11), 1587-1599. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01349.x>
- 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., & Paster, B. J. (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(10), 1279-1287.

<https://doi.org/10.1902/jop.2012.110566>

Dalpke, A., Frank, J., Peter, M., & Heeg, K. (2006). Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun*, 74(2), 940-946. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.940-946.2006>

De Nardo, D., De Nardo, C. M., Nguyen, T., Hamilton, J. A., & Scholz, G. M. (2009). Signaling crosstalk during sequential TLR4 and TLR9 activation amplifies the inflammatory response of mouse macrophages. *J Immunol*, 183(12), 8110-8118. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901031>

Desai, S. V., Love, R. M., Rich, A. M., & Seymour, G. J. (2011). Toll-like receptor 2 expression in refractory periapical lesions. *Int Endod J*, 44(10), 907-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01893.x>

Dezerega, A., Madrid, S., Mundi, V., Valenzuela, M. A., Garrido, M., Paredes, R., García-Sesnich, J., Ortega, A. V., Gamonal, J., & Hernández, M. (2012). Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm (Lond)*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-8>

Dorrington, M. G., & Fraser, I. D. C. (2019). NF-kappaB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front Immunol*, 10, 705. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00705>

Erridge, C., Kennedy, S., Spickett, C. M., & Webb, D. J. (2008). Oxidized Phospholipid Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) Signaling Is Restricted to TLR2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24748-24759. <https://doi.org/10.1074/jbc.m800352200>

Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G. P., Chapman, H. A., & Barton, G. M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 456(7222), 658-662. <https://doi.org/10.1038/nature07405>

Fernandez, A., Astorga, J., Bordagaray, M. J., Lira, M. J., Gebicke-Haerter, P. J., & Hernandez, M. (2022). Role of TLR9 methylation on its active transcription in apical inflammation. *Int Endod J*, 55(7), 784-794. <https://doi.org/10.1111/iej.13745>

Fernandez, A., Herrera, D., Hoare, A., Hernandez, M., & Torres, V. A. (2023). Lipopolysaccharides from *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* promote angiogenesis via Toll-like-receptors 2 and 4 pathways in vitro. *Int Endod J*. <https://doi.org/10.1111/iej.13957>

Garrido, M., Cárdenas, A. M., Astorga, J., Quinlan, F., Valdés, M., Chaparro, A., Carvajal, P., Pussinen, P., Huamán-Chipana, P., Jalil, J. E., & Hernández, M. (2019). Elevated Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in Young Adults with Endodontic Apical Lesions. *J Endod*, 45(2), 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.11.014>

- Gilkeson, G. S., Conover, J., Halpern, M., Pisetsky, D. S., Feagin, A., & Klinman, D. M. (1998). Effects of bacterial DNA on cytokine production by (NZB/NZW)F1 mice. *J Immunol*, *161*(8), 3890-3895.
- Gravina, H. D., Antonelli, L., Gazzinelli, R. T., & Ropert, C. (2013). Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, *8*(5), e63100.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063100>
- Gutmann, J. L., Baumgartner, J. C., Gluskin, A. H., Hartwell, G. R., & Walton, R. E. (2009). Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod*, *35*(12), 1658-1674.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.028>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, *10*(10), 717-725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Herrero, M. J. (2010). ABC de los «Toll-like receptors»: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, *11*(4), 135-143.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semreu.2010.04.005>
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., & Vogel, S. N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*, *69*(3), 1477-1482. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1477-1482.2001>
- Holla, L. I., Vokurka, J., Hrdlickova, B., Augustin, P., & Fassmann, A. (2010). Association of Toll-like receptor 9 haplotypes with chronic periodontitis in Czech population. *J Clin Periodontol*, *37*(2), 152-159.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01523.x>
- Holley, M. M., Zhang, Y., Lehrmann, E., Wood, W. H., Becker, K. G., & Kielian, T. (2012). Toll-like receptor 2 (TLR2)-TLR9 crosstalk dictates IL-12 family cytokine production in microglia. *Glia*, *60*(1), 29-42.
<https://doi.org/10.1002/glia.21243>
- Horiba, N., Maekawa, Y., Abe, Y., Ito, M., Matsumoto, T., & Nakamura, H. (1991). Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, *71*(4), 492-495.
[https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90438-i](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90438-i)
- Iqbal, Z., Seleem, M. N., Hussain, H. I., Huang, L., Hao, H., & Yuan, Z. (2016). Comparative virulence studies and transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals. *Scientific Reports*, *6*(1), 35442.
<https://doi.org/10.1038/srep35442>
- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Front Cell Infect Microbiol*, *9*, 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>

- Jiménez, C., Garrido, M., Pussinen, P., Bordagaray, M. J., Fernández, A., Vega, C., Chaparro, A., Hoare, A., & Hernández, M. (2022). Systemic burden and cardiovascular risk to Porphyromonas species in apical periodontitis. *Clinical Oral Investigations*, 26(1), 993-1001. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04083-4>
- Kajita, K., Honda, T., Amanuma, R., Domon, H., Okui, T., Ito, H., Yoshie, H., Tabeta, K., Nakajima, T., & Yamazaki, K. (2007). Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 22(6), 398-402. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00377.x>
- Kashuba, V. I., Protopopov, A. I., Kvasha, S. M., Gizatullin, R. Z., Wahlestedt, C., Kisselev, L. L., Klein, G., & Zabarovsky, E. R. (2002). hUNC93B1: a novel human gene representing a new gene family and encoding an unc-93-like protein. *Gene*, 283(1), 209-217. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00856-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00856-3)
- Kim, P. D., Xia-Juan, X., Crump, K. E., Abe, T., Hajishengallis, G., & Sahingur, S. E. (2015). Toll-Like Receptor 9-Mediated Inflammation Triggers Alveolar Bone Loss in Experimental Murine Periodontitis. *Infect Immun*, 83(7), 2992-3002. <https://doi.org/10.1128/iai.00424-15>
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., & Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M., & Hartmann, G. (2001). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α/β in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 31(7), 2154-2163. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200107\)31:7<2154::aid-immu2154>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<2154::aid-immu2154>3.0.co;2-u)
- Lai, C. H., Oshima, K., Slots, J., & Listgarten, M. A. (1992). Wolinella recta in adult gingivitis and periodontitis. *J Periodontal Res*, 27(1), 8-14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1992.tb02079.x>
- 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., & Reynolds, E. C. (2014). Macrophage depletion abates Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol*, 193(5), 2349-2362. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400853>
- Lenert, P., Yasuda, K., Busconi, L., Nelson, P., Fleenor, C., Ratnabalasuriar, R. S., Nagy, P. L., Ashman, R. F., Rifkin, I. R., & Marshak-Rothstein, A. (2009). DNA-like class R inhibitory oligonucleotides (INH-ODNs) preferentially block autoantigen-induced B-cell and dendritic cell activation in vitro and autoantibody production in lupus-prone MRL-Fas(lpr/lpr) mice in vivo. *Arthritis Res Ther*, 11(3), R79. <https://doi.org/10.1186/ar2710>
- Lenert, P. S. (2010). Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm*, 2010, 986596. <https://doi.org/10.1155/2010/986596>

- Li, M., Yu, J., Guo, G., & Shen, H. (2023). Interactions between Macrophages and Biofilm during *Staphylococcus aureus* - Associated Implant Infection: Difficulties and Solutions. *Journal of Innate Immunity*, 499-515.
<https://doi.org/10.1159/000530385>
- Lin, J., Huang, D., Xu, H., Zhan, F., & Tan, X. (2022). Macrophages: A communication network linking *Porphyromonas gingivalis* infection and associated systemic diseases. *Front Immunol*, 13, 952040.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.952040>
- Liu, R., Desta, T., Raptis, M., Darveau, R. P., & Graves, D. T. (2008). *P. gingivalis* and *E. coli* lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol*, 79(7), 1241-1247.
<https://doi.org/10.1902/jop.2008.070575>
- Man, S. M., Karki, R., & Kanneganti, T. D. (2016). DNA-sensing inflammasomes: regulation of bacterial host defense and the gut microbiota. *Pathog Dis*, 74(4), ftw028. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw028>
- Marchesan, J., Jiao, Y., Schaff, R. A., Hao, J., Morelli, T., Kinney, J. S., Gerow, E., Sheridan, R., Rodrigues, V., Paster, B. J., Inohara, N., & Giannobile, W. V. (2016). TLR4, NOD1 and NOD2 mediate immune recognition of putative newly identified periodontal pathogens. *Mol Oral Microbiol*, 31(3), 243-258. <https://doi.org/10.1111/omi.12116>
- Marolda, C. L., Lahiry, P., Vines, E., Saldias, S., & Valvano, M. A. (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol*, 347, 237-252. <https://doi.org/10.1385/1-59745-167-3:237>
- Marongiu, L., Gornati, L., Artuso, I., Zanoni, I., & Granucci, F. (2019). Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *J Leukoc Biol*, 106(1), 147-160. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1218-483RR>
- Marshall, J. D., Fearon, K. L., Higgins, D., Hessel, E. M., Kanzler, H., Abbate, C., Yee, P., Gregorio, J., Cruz, T. D., Lizcano, J. O., Zolotarev, A., McClure, H. M., Brasky, K. M., Murthy, K. K., Coffman, R. L., & Nest, G. V. (2005). Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species. *DNA Cell Biol*, 24(2), 63-72. <https://doi.org/10.1089/dna.2005.24.63>
- Martin, M., Katz, J., Vogel, S. N., & Michalek, S. M. (2001). Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol*, 167(9), 5278-5285.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5278>
- Matsumoto, F., Saitoh, S., Fukui, R., Kobayashi, T., Tanimura, N., Konno, K., Kusumoto, Y., Akashi-Takamura, S., & Miyake, K. (2008). Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(3), 693-699. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.130>
- Mendez, K. N., Hoare, A., Soto, C., Bugueno, I., Olivera, M., Meneses, C., Perez-Donoso, J. M., Castro-Nallar, E., & Bravo, D. (2019). Variability in Genomic and Virulent Properties of *Porphyromonas gingivalis* Strains Isolated

From Healthy and Severe Chronic Periodontitis Individuals. *Front Cell Infect Microbiol*, 9, 246.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00246>

MINSAL. (2011, Diciembre 2011). *Guía Clínica Urgencias Odontológicas Ambulatorias*. Minsal.

<https://www.minsal.cl/portal/url/item/7222b6448161ecb1e04001011f013f94.pdf>

Mirucki, C. S., Abedi, M., Jiang, J., Zhu, Q., Wang, Y. H., Safavi, K. E., Clark, R. B., & Nichols, F. C. (2014). Biologic activity of porphyromonas endodontalis complex lipids. *J Endod*, 40(9), 1342-1348.

<https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.02.017>

Mohammadinia, M., Rahmani, S., Eslami, G., Ghassemi-Broumand, M., Aghazadh Amiri, M., Aghaie, G., Tabatabaee, S.

M., Taheri, S., & Behgozin, A. (2012). Contact lens disinfecting solutions antibacterial efficacy: comparison between clinical isolates and the standard ISO ATCC strains of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. *Eye*, 26(2), 327-330. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.284>

Mussbacher, M., Derler, M., Basilio, J., & Schmid, J. A. (2023). NF-kappaB in monocytes and macrophages - an inflammatory master regulator in multitasking immune cells. *Front Immunol*, 14, 1134661.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1134661>

Noursadeghi, M., Tsang, J., Hausteiner, T., Miller, R. F., Chain, B. M., & Katz, D. R. (2008). Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. *J Immunol Methods*, 329(1-2), 194-200.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.10.015>

O'Mahony, A., Lin, X., Geleziunas, R., & Greene, W. C. (2000). Activation of the heterodimeric IKKalpha kinase complex is directional: IKKalpha regulates IKKbeta under both basal and stimulated conditions. *Mol Cell Biol*, 20(4), 1170-1178. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.4.1170-1178.2000>

Papadopoulos, G., Weinberg, E. O., Massari, P., Gibson, F. C., 3rd, Wetzler, L. M., Morgan, E. F., & Genco, C. A. (2013).

Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. *J Immunol*, 190(3), 1148-1157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202511>

Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42, 80-87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x>

Peer, D., Park, E. J., Morishita, Y., Carman, C. V., & Shimaoka, M. (2008). Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science*, 319(5863), 627-630.

<https://doi.org/10.1126/science.1149859>

Pereira, C. V., Stipp, R. N., Fonseca, D. C., Pereira, L. J., & Höfling, J. F. (2011). Detection and clonal analysis of anaerobic bacteria associated to endodontic-periodontal lesions. *J Periodontol*, 82(12), 1767-1775.

<https://doi.org/10.1902/jop.2011.110063>

- Pérez-Chaparro, P. J., Gonçalves, C., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P., & Feres, M. (2014). Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res*, *93*(9), 846-858. <https://doi.org/10.1177/0022034514542468>
- Reyes, P.-O. D., Silva Patricio, Venegas Sebastián, Criollo Alfredo, Torres Vicente A. (2019). Nuclear accumulation of β -catenin is associated with endosomal sequestration of the destruction complex and increased activation of Rab5 in oral dysplasia [Research Article]. *The FASEB Journal*, *00*(00), 1-17. <https://doi.org/10.1096/fj.201902345RR>
- Rôças, I. N., Siqueira, J. F., Jr., & Debelian, G. J. (2011). Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod*, *37*(9), 1206-1212. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.026>
- Sahingur, S. E., Xia, X. J., Alamgir, S., Honma, K., Sharma, A., & Schenkein, H. A. (2010). DNA from Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia induce cytokine production in human monocytic cell lines. *Mol Oral Microbiol*, *25*(2), 123-135. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2009.00551.x>
- Sahingur, S. E., Xia, X. J., Gunsolley, J., Schenkein, H. A., Genco, R. J., & De Nardin, E. (2011). Single nucleotide polymorphisms of pattern recognition receptors and chronic periodontitis. *J Periodontol Res*, *46*(2), 184-192. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01327.x>
- Sahingur, S. E., Xia, X. J., & Schifferle, R. E. (2012). Oral bacterial DNA differ in their ability to induce inflammatory responses in human monocytic cell lines. *J Periodontol*, *83*(8), 1069-1077. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110522>
- Saiga, H., Shimada, Y., & Takeda, K. (2011). Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin Dev Immunol*, *2011*, 347594. <https://doi.org/10.1155/2011/347594>
- Seol, J. H., Cho, B. H., Chung, C. P., & Bae, K. S. (2006). Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod*, *32*(2), 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.020>
- Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Aguillon, J. C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R., & Gamonal, J. (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*(3), 206-214. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01190.x>
- Sima, C., & Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontol 2000*, *63*(1), 80-101. <https://doi.org/10.1111/prd.12032>
- Stacey, K. J., Idris, A., Sagulenko, V., Vitak, N., & Sester, D. P. (2016). Methods for Delivering DNA to Intracellular Receptors. *Methods Mol Biol*, *1390*, 93-106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3335-8_6

- Stamenkovic, A., Pierce, G. N., & Ravandi, A. (2019). Oxidized lipids: not just another brick in the wall. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 97(6), 473-485. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0490>
- Tang, Y., Sun, F., Li, X., Zhou, Y., Yin, S., & Zhou, X. (2011). Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of Escherichia coli lipopolysaccharide. *J Endod*, 37(12), 1653-1658. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.015>
- Trinh, T. A., Hoang, T. X., & Kim, J. Y. (2020). All-trans retinoic acid increases NF- κ B activity in PMA-stimulated THP-1 cells upon unmethylated CpG challenge by enhancing cell surface TLR9 expression. *Mol Cell Biochem*, 473(1-2), 167-177. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03817-4>
- Tsai, C. M., & Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 119(1), 115-119. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90673-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90673-x)
- Vadillo, E., & Pelayo, R. (2012). [Toll-like receptors in development and function of the hematopoietic system]. *Rev Invest Clin*, 64(5), 461-476. (Los receptores tipo toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyéico.)
- Veloso, P., Fernandez, A., Astorga, J., Gonzalez-Quintanilla, D., Castro, A., Escobar, A., Hoare, A., & Hernandez, M. (2022). Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis, but Not from Porphyromonas endodontalis, Induces Macrophage M1 Profile. *Int J Mol Sci*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710011>
- Von Schlieffen, E., Oskolkova, O. V., Schabbauer, G., Gruber, F., Blüml, S., Genest, M., Kadl, A., Marsik, C., Knapp, S., Chow, J., Leitinger, N., Binder, B. R., & Bochkov, V. N. (2009). Multi-Hit Inhibition of Circulating and Cell-Associated Components of the Toll-Like Receptor 4 Pathway by Oxidized Phospholipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(3), 356-362. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.173799>
- Wang, Q., Zhou, X. D., Zheng, Q. H., Wang, Y., Tang, L., & Huang, D. M. (2010). Distribution of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. *J Endod*, 36(11), 1790-1795. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.018>
- Zhu, F.-G., Reich, C. F., & Pisetsky, D. S. (2001). The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology*, 103(2), 226-234. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01222.x>

APENDICE

1. La extracción de ADN con TRIzol™ permitió obtener ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y del aislado clínico.

Se evaluó la concentración y calidad de ADN bacteriano extraído. Ambos, el ADN de la cepa de referencia de *P. endodontalis* ATCC 35406 (*Pe*) y aislado clínico (*PeC*) presentaron calidad óptima en el análisis espectrofotométrico a 260/280 nm (1,8 y 2,0 ng/μL), indicando que el ADN obtenido está libre de contaminación con proteínas y ARN (Tabla 2). Además se comprobó la pureza e integridad del ADN, mediante ensayo de Bradford, ensayo de Purpald, electroforesis en geles de agarosa teñidos con GelRed™ y electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con plata; para la detección de proteínas, niveles de Ácido 3-desoxi-D-manno-oct-2-ulosónico (KDO), componente del core del LPS (Marolda et al., 2006), ácidos nucleicos y lipopolisacárido, respectivamente (Tabla 2, Figura 6 y 7). Tanto el ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y aislado clínico presentaron ausencia de proteínas, banda de ADN íntegro y ausencia de LPS en los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñidos con plata. Pese a lo anterior, el ADN de *P. endodontalis* aislado clínico evidenció trazas de KDO (33 μg/mL) y no así el ADN de referencia ATCC 35406 (< 4 μg/mL) que tuvo concentraciones bajo el límite de detección de la técnica (4 μg/mL).

Tabla suplementaria 1. Concentración, calidad y cuantificación de proteínas en ADN bacteriano extraído.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Razón A260/280	KDO (μg/mL)	Concentración de proteínas (μg/μL)
ADN <i>Pe</i>	1092,5	1,9*	<4	0
ADN <i>PeC</i>	1286,5	1,8*	33	0

Pe: ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406, *PeC*: ADN de Aislado clínico endodóntico de *P. endodontalis* 4ecol7. *Calidad óptima (DO 1,8-2,0).

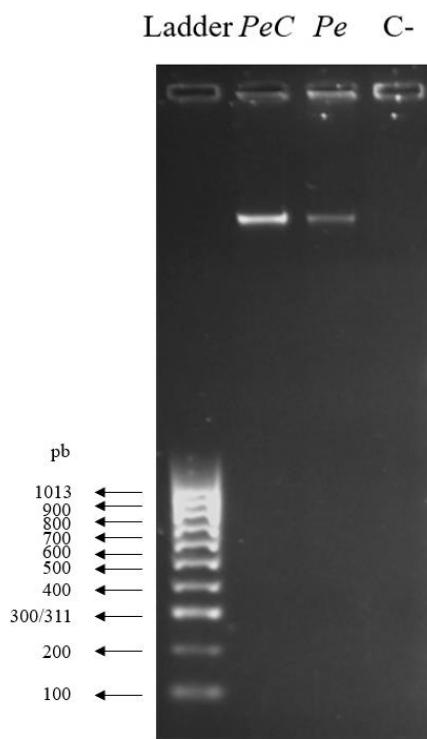


Figura suplementaria 1. Perfil electroforético de ADN bacteriano purificado en gel de agarosa 2%.

Pe: ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y *PeC*: ADN de *P. endodontalis* aislado clínico. C-: Control negativo.

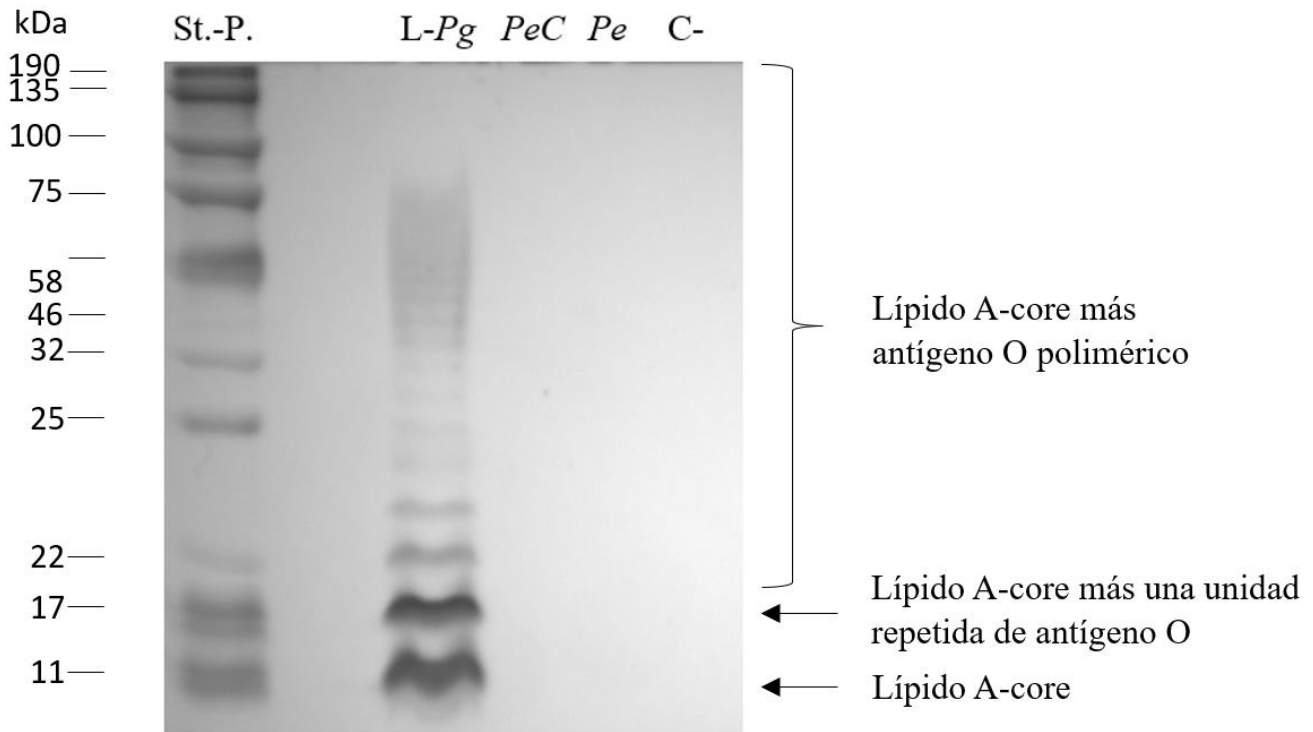


Figura suplementaria 2. Análisis del perfil electroforético del LPS en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con plata. St.-P.: Estándar de proteínas; L-Pg: Lisado de *P. gingivalis* ATCC 33207 PeC: ADN de *P. endodontalis* aislado clínico; Pe: ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y C-: Control negativo.

2. Estandarización de la concentración de agonista e inhibidor de TLR-9.

2.1 El agonista de TLR-9 indujo cambios en la expresión de mRNA de TNF- α con efecto dosis dependiente.

Con el propósito de evaluar la activación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*, realizamos un preliminar para estandarizar el uso del agonista de TLR-9 (ODN 2006) como control positivo. Se evaluaron los niveles mRNA de TNF- α de macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 con PMA (10nM) estimulados por 1 hora con 100 μ g/ml de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y con ODN 2006 1 μ M y 2,5 μ M, según el rango de concentración establecido por el fabricante y la literatura (Bauer et al., 2001; Krieg et al., 1995; Krug et

al., 2001; Marshall et al., 2005). Observamos un aumento dosis-dependiente de los niveles de mRNA TNF- α en macrófagos tratados con ODN 2006 a 2,5 μ M y a 1 μ M en comparación al control sin estimular (Figura suplementaria 3).

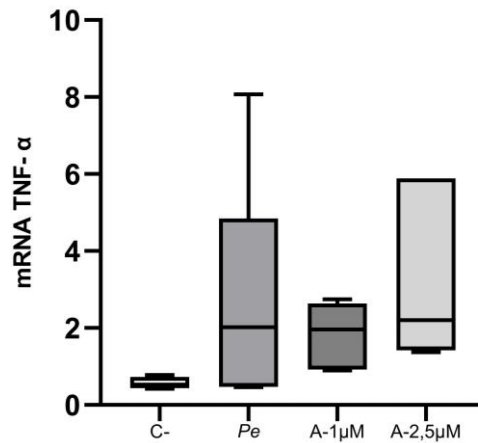


Figura suplementaria 3. Niveles de transcritos de TNF- α en macrófagos estimulados con agonista (A) de TLR-9. Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron estimuladas con agonista de TLR-9 (ODN 2006; 1 μ M y 2,5 μ M). Los niveles de expresión génica relativa de TNF- α fueron normalizados en relación con 18S rRNA y expresado como la diferencia entre $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se realizaron 2 experimentos independientes (N=2), cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. C-, macrófagos sin estímulo. *Pe*, ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406.

2.2 El inhibidor de TLR-9 indujo cambios en los niveles de mRNA de TNF- α con efecto dosis dependiente.

Con el propósito de evaluar la activación de TLR-9 en la respuesta inflamatoria inducida por ADN de *P. endodontalis*, realizamos un preliminar para estandarizar el uso del inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18). Se evaluaron los niveles mRNA de TNF- α de macrófagos diferenciados a partir de

células THP-1 con PMA (10nM) estimulados por 1 hora con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de *P. endodontalis* ATCC 35406 y con ODN INH-18 0,1 μM y 1 μM , según el rango de concentración establecido por el fabricante y la literatura (Lenert et al., 2009). Observamos una disminución dosis-dependiente de los niveles de mRNA TNF- α en macrófagos tratados con ODN INH-18 a 1 μM y a 0,1 μM en comparación al control sin estimular (Figura suplementaria 3).

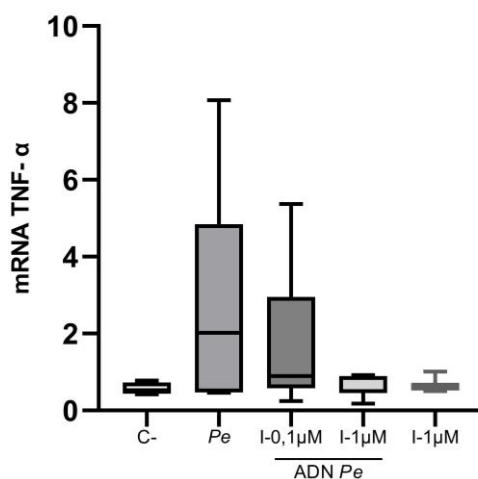


Figura suplementaria 4. Niveles de transcritos de TNF- α en macrófagos tratados con Inhibidor de TLR-9 (I) y estimulados con ADN de *P. endodontalis* (ADN *Pe*). Células THP-1 diferenciadas a macrófagos *in vitro* fueron tratadas previamente durante 30 minutos con inhibidor de TLR-9 (ODN INH-18; 0,1 μM y 1 μM) y estimuladas con ADN *Pe*. (ATCC 35406; 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 60 minutos. Los niveles de transcritos de TNF- α fueron normalizados en relación con 18S mRNA y expresado como la diferencia entre $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Se realizaron 2 experimentos independientes (N=2), cada uno en triplicado. Gráficos de caja y bigote representan la mediana y el recorrido intercuartílico. C-, macrófagos sin estímulo.