



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

"Regulación de Survivina en Células Epiteliales Gingivales Infeccionadas por *Porphyromonas gingivalis*"

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

Ignacio Felipe Lobos Matthei

Directora: Dra. Denisse Bravo Rodríguez
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Patrocinante: Dr. Sergio Álvarez Armijo
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Co-director: Dr. José Manuel Pérez Donoso
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Andrés Bello

Santiago de Chile, 2014

Proyecto FONDECYT 11110076

Proyecto U-INICIA 11/10

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me gustaría agradecer, ya que este logro no es solo mío, sino también de todas las personas que lo hicieron posible.

Primero agradecer a mi familia. A mis padres por su infinito amor, paciencia y compañía, no se podría haber pedido mejores en este mundo. A mi hermano Gonzalo que está en su propio viaje y le deseo siempre lo mejor. A mis tíos, primos y abuelas que están incondicionalmente cuando se les necesita.

A la gente que estuvo directamente involucrada en el desarrollo de este trabajo. A mis directores de tesis Dra. Denisse Bravo y Dr. Pérez. A Anilei, Samantha, Christopher, Darna, Daniela y Maximiliano, sin ustedes no hubiese sido posible.

A la comisión evaluadora, que no solo son excelentes docentes si no también excelentes personas. Al Dr. Carlos Santiviago, Dr. Hernán Lara, y a mi patrocinante, el Dr. Sergio Álvarez. Gracias por su tiempo y preocupación.

A los "cabros". Gracias a Pablo B., Nicolás, Javier, Sebastián, Pablo M., Ignacio, Rodrigo. También a las niñas, que traían el toque femenino al grupo, a Camila, Verónica, Cynthia y Valentina. Hicieron que cada momento valiera la pena en este camino que tomamos juntos sin querer, y espero que vayamos sumando historias por mucho tiempo.

A los amigos, que son parte fundamental de ser feliz. Al Gonzalo V. por años de amistad y buena música. A la Valentina y Gonzalo Vildósola, que son un ejemplo de bondad y alegría. A Pilar, Paulina, Constanza, Patricio y Pamela. Son incontables los momentos de risas y alegrías.

Y para terminar, a Dominic, sin saberlo te has convertido en parte fundamental de mi vida, agradezco eternamente tu apoyo, compañía y amor. Te amo.

Por lo que termina, pero también por lo que se avecina, gracias a todos.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Periodontitis.....	1
1.2 Etiología de la periodontitis.....	2
1.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
1.4 Mecanismos de virulencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	6
1.5 <i>Porphyromonas gingivalis</i> y apoptosis.....	7
2. HIPÓTESIS.....	11
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1 Instrumentos y equipos.....	12
4.2 Materiales.....	12
4.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	13
4.3.1 Condiciones de cultivo bacteriano.....	14
4.4 Cultivo celular.....	15
4.4.1 Condiciones de cultivo celular.....	15
4.5 Protocolo de infección de células con <i>P. gingivalis</i>	16
4.6 Análisis de la proteína survivina mediante SDS-PAGE Western blot.....	17

4.6.1 Extracción de proteínas.....	17
4.6.2 Western blot	17
4.7 Análisis transcripcional de survivina	18
4.7.1 Extracción de ARN	18
4.7.2 Digestión ADN / Transcripción Reversa	19
4.7.3 Amplificación de survivina por PCR.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Niveles proteicos de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos y tardíos post-invasión por <i>P. gingivalis</i> 33277, W50 o CP3	21
5.2 Niveles de transcrito de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos y tardíos tras la invasión de <i>P. gingivalis</i> 33277, W50 o CP3	25
6. DISCUSIÓN	30
7. CONCLUSIONES	37
8. REFERENCIAS	38
9. ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Comparación entre salud y enfermedad en el periodonto.	2
Figura 2.	Asociación entre especies bacterianas en enfermedad periodontal.	4
Figura 3.	Efecto de cepas de <i>P. gingivalis</i> W50, 33277 y CP3 sobre los niveles proteicos de Survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2h) post invasión.	23
Figura 4.	Efecto de cepas de <i>P. gingivalis</i> W50, 33277 y CP3 sobre los niveles proteicos de Survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tardíos (24h) post invasión.	24
Figura 5.	Efecto de cepas de <i>P. gingivalis</i> W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de ARN mensajero de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2h) post invasión.	27
Figura 6.	Efecto de cepas de <i>P. gingivalis</i> W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de ARN mensajero de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tardíos (24h) post invasión.	29
Figura 7.	Estandarización de RT-PCR.	43
Figura 8.	Variación en el tiempo de los niveles de proteína y transcrito de controles sin infectar.	44
Figura 9.	Comparación del efecto de cepas de <i>P. gingivalis</i> W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de ARN mensajero de survivina sin normalizar en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2 h) y tardíos (24 h) post-invasión.	45
Figura 10.	Posibles vías que relacionan la infección por <i>P. gingivalis</i> con la disminución de survivina en GECs.	46

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	análisis de varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ATCC	colección americana de cultivos tipo
BCA	ácido biocinconínico
BHI	infusión corazón cerebro
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucleótidos trifosfatos
DO	densidad óptica
ECL	quimioluminiscencia electrogenerada
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GEC	célula epitelial gingival
IL-8	interleucina 8
KSFM	medio de crecimiento libre de suero para queratinocitos
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
M-MLV RT	transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MOI	multiplicidad de infección
NIC	nivel de inserción clínica
OMS	organización mundial de la salud

OVA	ortovanadato de sodio
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RT	transcripción reversa
SDS	dodecilsulfato de sodio
WB	Western blot

RESUMEN

La periodontitis crónica es una enfermedad de etiología infecciosa, caracterizada por la respuesta inflamatoria e inmune exacerbada por parte del hospedero que produce la destrucción de tejidos de soporte del diente. Actualmente, se postula que para el establecimiento de esta patología se produce una sucesión ecológica desde una comunidad microbiana asociada a salud hacia una asociada a enfermedad periodontal. En esta sucesión es imprescindible la presencia de ciertos patógenos que faciliten el remodelamiento de la microbiota oral y la progresión hacia enfermedad, siendo *Porphyromonas gingivalis* un patógeno clave en este proceso.

P. gingivalis es una bacteria anaerobia estricta capaz de invadir y permanecer al interior de células epiteliales gingivales. Interesantemente, la infección por *P. gingivalis* produce una mayor viabilidad celular, mediante la modulación de proteínas relacionadas con apoptosis. Se ha sugerido que la proteína inhibidora de la apoptosis, survivina, podría contribuir a la inhibición de la apoptosis mediada por *P. gingivalis*; sin embargo, su participación en este proceso no está completamente dilucidada.

En esta memoria de título se estudió si *P. gingivalis* es capaz de modular los niveles de survivina en la línea celular de epitelio gingival OKF6/TERT2 y si esta modulación está relacionada con el grado de virulencia de la bacteria. Para ello, se infectaron células OKF6/TERT2 utilizando dos cepas de referencia y un aislado clínico, cada una con diferente virulencia. Luego, se determinaron los niveles de proteína y transcrito de survivina a tiempos tempranos y tardíos post-invasión, mediante Western blot y RT-PCR. Los resultados obtenidos indican que *P. gingivalis* es capaz de disminuir los niveles de survivina y que esta modulación podría estar relacionada con la virulencia de la bacteria. Sin embargo, la disminución de survivina no estaría relacionada directamente con la inhibición de apoptosis que genera la infección por *P. gingivalis*.

ABSTRACT

Survivin regulation in gingival epithelial cells infected by Porphyromonas gingivalis.

Chronic periodontitis is an infectious disease characterized by an exacerbated inflammatory and immune response by the host, which causes the destruction of the tooth supporting tissues. Nowadays, it is assumed that for the onset of this pathology an ecological succession from a bacterial community associated to health, to one associated with periodontal disease is produced. In this succession, the presence of certain pathogens facilitate the remodeling of the oral microbiota and the consequent progression to disease, being *Porphyromonas gingivalis* a key pathogen in this process.

P. gingivalis is a strict anaerobic bacterium capable of invading and persisting within gingival epithelial cells. Interestingly, infection by *P. gingivalis* produce an increase in the viability of these cells by modulation of apoptosis related proteins. It has been suggested that the apoptosis inhibitory protein, survivin, could contribute to the inhibition of apoptosis mediated by *P. gingivalis*; however, its participation in this process is still unknown.

In this work, we studied whether *P. gingivalis* is capable of modulate survivin levels in gingival epithelial cells OKF6/TERT2 and if this modulation is related to bacterial virulence. To achieve this goals we infected OKF6/TERT2 cells with two reference strains and one clinical isolate, each with different virulence. Survivin protein and transcript levels were determined at early and late post-infection times by Western blot and RT-PCR. The results of this work indicated that *P. gingivalis* is capable of decreasing survivin levels and this modulation could be related to virulence features of the bacterium. Nevertheless, survivin decrease would not be directly related to the inhibition of apoptosis induced by *P. gingivalis*.

1. ANTECEDENTES

1.1 Periodontitis

La periodontitis crónica es una enfermedad de etiología infecciosa, caracterizada por una respuesta inflamatoria exacerbada que produce la destrucción de las estructuras que dan soporte al diente, incluyendo la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. La destrucción de estos tejidos de soporte puede llegar incluso a la pérdida de los dientes afectados (Figura 1) (Choi & Seymour, 2010). La periodontitis es un problema a nivel mundial, afectando cerca de un 35-50% de la población adulta según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Petersen & Bourgeois, 2005). En Chile, se ha demostrado que la pérdida de inserción en piezas dentales (de un sitio o más) incrementa con la edad, aumentando de un 39% en adultos jóvenes a un 69% en adultos mayores. Más aún, si se utilizan criterios de diagnóstico menos severos, estos valores incrementan a un 93% y 98% respectivamente. Además, el género, nivel educacional y el hábito de fumar se presentan como los principales indicadores de riesgo asociados al desarrollo de los cuadros clínicos más severos, entre ellos periodontitis (Gamonal et al., 2010).

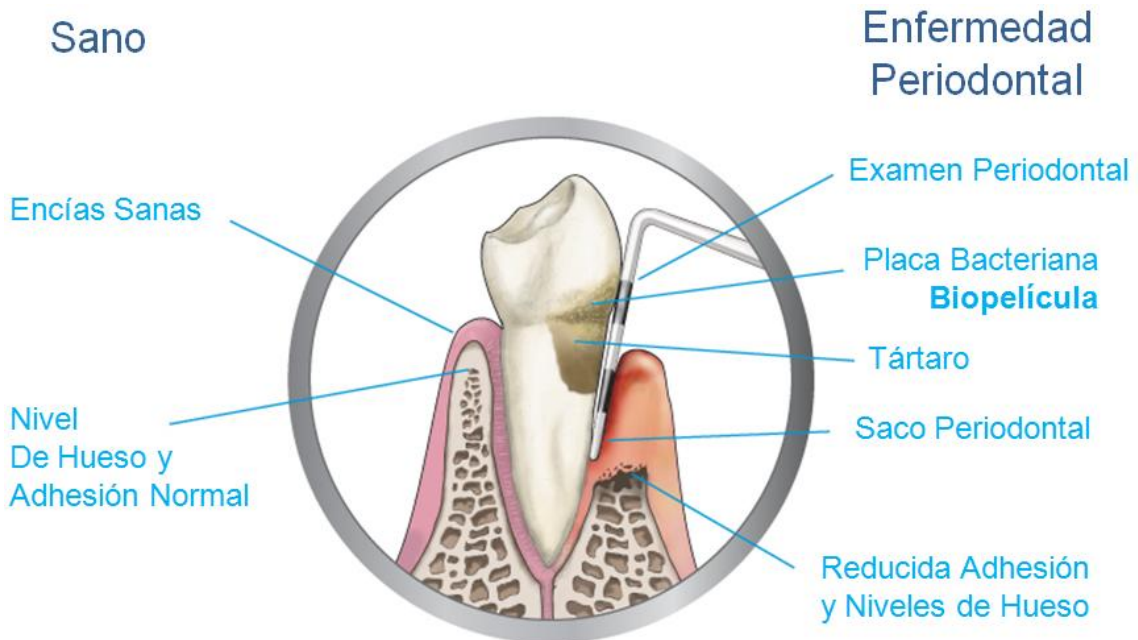


Figura 1. Comparación entre salud y enfermedad en el periodonto. La porción izquierda de la encía y pieza dental corresponde a un sujeto sano. La porción derecha corresponde a un sujeto con enfermedad periodontal, y sus signos característicos (Modificado de la página web Periowave).

1.2 Etiología de la periodontitis

La etiología de la periodontitis es multifactorial, comenzando con el establecimiento de una biopelícula subgingival compleja conformada tanto por bacterias Gram positivo como Gram negativo en contacto con los tejidos periodontales en la cavidad oral (Clark & Løe, 1993). Existen sobre 700 organismos reconocidos como componentes posibles de esta biopelícula, de los cuales alrededor de 200 pueden estar presentes en cualquier individuo y 50 en cualquier sitio periodontal (Aas et al., 2005). El hecho que sea una comunidad bacteriana heterogénea da lugar a interacciones competitivas, oportunistas y sinérgicas entre especies que dan forma al ecosistema, permitiendo la colonización por parte de nuevas especies (Hansen et al., 2007; Jenkinson et al., 2005). A su vez, esta sucesión ecológica es la primera etapa

en la iniciación de los procesos inmunes e inflamatorios que causan la destrucción de los tejidos que rodean y sostienen el diente y que, si no es tratada, desemboca en la inminente pérdida de la pieza dental (Kinane et al., 2008).

A través de los años han surgido variadas hipótesis sobre cómo se inicia el proceso de sucesiones ecológicas en la biopelícula subgingival. En el trabajo de Socransky et al. 1998 se realizó una caracterización de patógenos subgingivales presentes en salud y enfermedad periodontal en base a 13.264 muestras de 185 pacientes. Este estudio permitió la agrupación de comunidades de acuerdo a su cercanía taxonómica y a su frecuencia de detección en salud y enfermedad (Figura 2). El primer grupo, denominado complejo rojo, está conformado por *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*. El segundo, denominado complejo naranja, está compuesto por *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*. Las 3 especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a, forman el complejo verde. El denominado complejo amarillo está compuesto por streptococci: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus oralis*; y finalmente el quinto grupo, denominado complejo púrpura, consistente en *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula*. Esta clasificación en base a colores no solo da cuenta de la asociación entre especies, sino que también nos entrega información sobre el orden de colonización, a qué profundidad de sondaje se encuentra cada especie y su asociación a la severidad de la enfermedad (Figura 2). Es así como los participantes del complejo rojo fueron encontrados más frecuentemente en pacientes con enfermedad periodontal, particularmente *P. gingivalis*, el cual ha sido descrito como un agente etiológico

clave en el establecimiento y progresión de la periodontitis (Byrne et al., 2009; Lamont et al., 1998; Socransky et al., 1998).

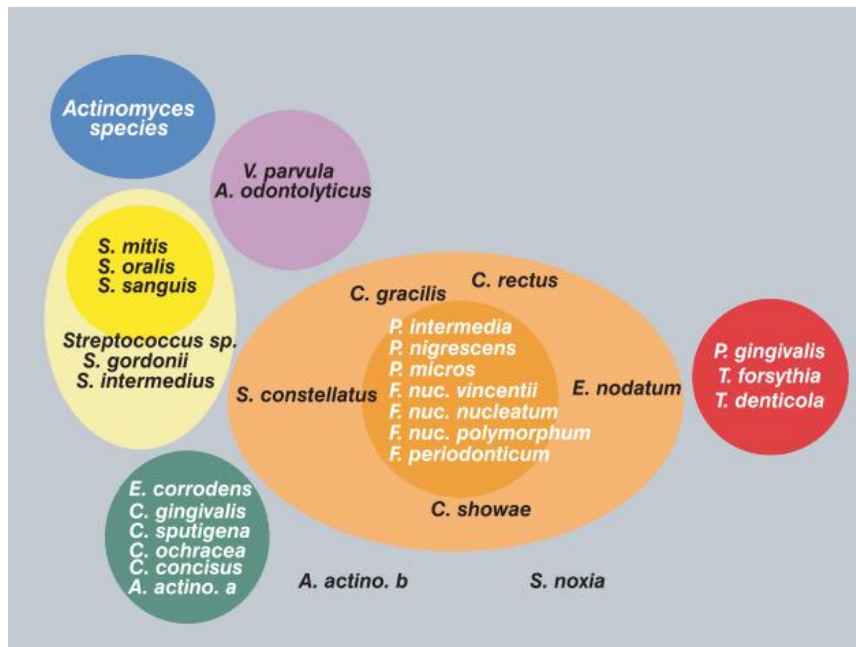


Figura 2. Asociación entre especies bacterianas en enfermedad periodontal. Diagrama agrupando las distintas comunidades bacterianas, su asociación entre ellas y su relación con la severidad de la enfermedad periodontal. A cada grupo se le asigna un color, siendo el grupo rojo aquel más asociado a enfermedad (Socransky et al., 2005).

En la actualidad, la evidencia apunta a que la alteración en el equilibrio de la microbiota subgingival (disbiosis) está asociada a variaciones en la composición de las comunidades bacterianas y las interacciones entre las especies que las componen. Producto de esta disbiosis se genera una respuesta inmune inflamatoria sostenida por parte del hospedero, que genera un daño progresivo de los tejidos de soporte del diente, como hueso alveolar, ligamento periodontal y fibras gingivales. Este daño de los tejidos produce la generación de un saco periodontal entre la gíngiva y el diente, que posee características propicias para el incremento en la carga de patógenos

anaerobios como *P. gingivalis* (Figura 1) (Loesche et al., 2001; Socransky et al., 1998).

Estas interacciones afectarían la regulación de genes, adquisición de nutrientes y transferencia horizontal de genes, entre otras, permitiendo así que la comunidad se mantenga y prospere en el tiempo (Hajishengallis & Lamont, 2012). Sumado a esto, la liberación de enzimas proteolíticas y la presencia de patógenos clave, entre ellos *P. gingivalis*, determinan una relación sinérgica entre los patógenos presentes que les permite resistir al sistema inmune innato y adquirido del hospedero, contribuyendo a la inflamación y progresión de la enfermedad (Hajishengallis & Lamont, 2012).

1.3 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis es un cocobacilo Gram negativo, asacarolítico, anaerobio estricto, no mótil y cuyas colonias se pigmentan de negro en agar sangre suplementado con hemina y menadiona (Shah & Collins, 1988). Este patógeno requiere hierro en forma de hemina para su crecimiento y virulencia (Lamont & Jenkinson, 1998; McKee & McDermid, 1986), lo que hace de lugares con baja tensión de oxígeno y provisión nutricional compleja, como la región subgingival, un lugar propicio para que este organismo colonice y prospere (Lamont & Jenkinson, 2000).

Una de las características adaptativas de *P. gingivalis* es su capacidad de colonizar y perturbar la estabilidad estructural y funcional del epitelio de unión mediante la liberación de cisteína proteasas (Hintermann et al., 2002). De esta forma, genera nuevos sitios donde extender su colonización (Bosshardt & Lang, 2005).

En personas periodontalmente sanas, *P. gingivalis* es menos prevalente en el surco gingival (doce veces menor en comparación a pacientes con periodontitis), lo que demostraría que la sola presencia de *P. gingivalis* no es

suficiente para producir periodontitis, si no la suma de factores que en su conjunto generarían finalmente la enfermedad (van Winkelhoff et al., 2002). Por otra parte, existe una correlación entre la cantidad de *P. gingivalis* y marcadores clínicos asociados al diagnóstico de periodontitis, como por ejemplo la profundidad de sondaje del saco periodontal, donde un incremento en 1 mm de profundidad se asocia a un aumento en la carga de *P. gingivalis* 10 veces mayor, o la pérdida de hueso alveolar, que se correlaciona con un aumento en la concentración de *P. gingivalis* en saliva (Kawada et al., 2004; Salminen et al., 2014). Además, luego del tratamiento periodontal se observa una reducción en la cantidad de *P. gingivalis* que está asociada con una remisión de la enfermedad en el sitio afectado (Haffajee et al., 1998).

1.4 Mecanismos de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*

A pesar que se desconoce exactamente el mecanismo mediante el cual se desencadena la periodontitis, se sabe que *P. gingivalis* posee un amplia gama de mecanismos para promover su crecimiento intracelular, evadir la respuesta inmune y favorecer la colonización. De hecho, se ha determinado que en estadios tempranos de infección *P. gingivalis* es capaz de invadir un amplio rango de células epiteliales humanas, así como persistir y replicarse intracelularmente, lo que podría ayudar a evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune (Inaba et al., 2006; Papapanou et al., 1994; Yilmaz & Jungas, 2004; Yilmaz et al., 2003; Yilmaz et al., 2002).

En el saco periodontal, las células epiteliales gingivales (GECs) representan la mayor área de contacto para estas bacterias, y el sitio inicial de interacción con el hospedero. En la proximidad de la superficie de las células, *P. gingivalis* secreta proteasas y fosfatasas, lo que provoca la inactivación de vías de señalización como la de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), lo cual previene la activación del factor transcripcional NF-kappa B (NF-κB) y

consecuentemente reduce la producción de IL-8, evitando así la estimulación de la respuesta inmune. También induce el remodelamiento del citoesqueleto, favoreciendo la internalización de la bacteria a la célula hospedera (Tribble & Lamont, 2010).

Resulta particularmente interesante que las células epiteliales gingivales mantengan su viabilidad tras la internalización de *P. gingivalis* (Madianos et al., 1996; Nakhjiri et al., 2001). En este contexto, es importante notar que en queratinocitos gingivales humanos inmortalizados (HIGK por su nombre en inglés) infectados con *P. gingivalis* se produce un aumento en la expresión de 55 genes relacionados con la modulación de apoptosis, los cuales se asocian en su mayoría a factores que aumentan la supervivencia y proliferación celular del hospedero (Handfield et al., 2005). Más aún, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que la infección por *P. gingivalis* aumenta la viabilidad y disminuye la apoptosis de la línea de GECs inmortalizadas OKF6/TERT2 (González, 2013). Estos antecedentes sugieren que el proceso de colonización induce la expresión de efectores que incrementan la supervivencia celular y disminuyen la apoptosis; sin embargo, el mecanismo por el cual la bacteria es capaz de modular este proceso no ha sido completamente dilucidado.

1.5 *Porphyromonas gingivalis* y apoptosis

La apoptosis se produce mediante dos rutas principales. Una vía extrínseca mediada por receptores tipo Fas y una vía intrínseca mediada por la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria. Ambas vías producen la activación secuencial de una serie de proteasas llamadas caspasas, que generan una cascada de señalización que induce la apoptosis celular (Hail et al., 2006).

En cultivo primarios de GECs se ha descrito que *P. gingivalis* inhibe principalmente la vía intrínseca a través de la regulación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la inhibición de la liberación de citocromo *c* (Yilmaz & Jungas, 2004). También en cultivo primario, se ha descrito que *P. gingivalis* bloquearía la apoptosis a través de la vía JAK/Stat, que a su vez modula la vía intrínseca y regula la expresión de varias proteínas, incluyendo el inhibidor de apoptosis survivina (Mao et al., 2007). Por su parte, survivina es capaz de modular la apoptosis mediante varios mecanismos: estabilizando inhibidores de apoptosis como XIAP (Dohi et al., 2004) o bloqueando mediadores pro-apoptóticos como Smac (Sun et al., 2005).

En otros modelos de infección se ha determinado que la proteína survivina es clave en la modulación de la apoptosis mediada por bacterias. Por ejemplo, la infección de *Helicobacter pylori* provoca un aumento en la apoptosis y pérdida de viabilidad en células del epitelio gástrico mediante la disminución en los niveles de survivina (Valenzuela et al., 2010). Por otro lado, la infección de la línea celular de monocitos humanos U937 con *Staphylococcus aureus* provoca un aumento en la apoptosis de estas células, debido en parte a una disminución en los niveles de survivina (Wang et al., 2010).

Los niveles de survivina pueden ser regulados tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (Morin, 1999; Zhao et al., 2000). Un importante mecanismo involucrado en la regulación transcripcional de survivina está relacionado con la entrada al núcleo de β -catenina y la subsecuente activación de la familia de factores transcripcionales Tcf-Lef (Morin, 1999; Tapia et al., 2006). Por otra parte, la regulación post-traducciona de survivina ocurre mediante la poliubiquitinación de la proteína y su consecuente degradación por la vía del proteosoma 26S (Zhao et al., 2000).

En este contexto, se ha reportado que la infección de GECs por *P. gingivalis* podría estar relacionada con survivina; sin embargo, existen trabajos contradictorios al respecto. En un trabajo publicado por Lucas et al. (2010) se observó que en tejido de pacientes con enfermedad periodontal los niveles de survivina eran dos veces mayores que en pacientes sanos, aunque no se observaron diferencias a nivel del ARN mensajero (ARNm). Asimismo, Li et al. (2014) observaron que en una línea celular epitelial respiratoria no existen variaciones en los niveles del mensajero de survivina a través del tiempo, tras ser infectados con *P. gingivalis*. Estos resultados se contradicen con un trabajo publicado por Urnoway et al. (2006), donde se demostró que la infección de cultivos primarios de GECs por *P. gingivalis* induce activación de NF- κ B, lo cual correlacionan con un aumento de ARNm de survivina. Por lo tanto, si bien estos antecedentes sugieren que survivina podría estar relacionada con la inhibición de apoptosis mediada por *P. gingivalis*, aún se necesitan estudios para determinar cuál es su contribución y a qué nivel sería regulada por la bacteria para inhibir la apoptosis en GECs.

Adicionalmente, resultados de nuestro laboratorio sugieren que la modulación de apoptosis por *P. gingivalis* en GECs inmortalizadas es dependiente de la virulencia de la bacteria, ya que cepas con mayor virulencia son capaces de inhibir la apoptosis con mayor eficiencia (González, 2013). No obstante, queda aún por determinar si existe relación entre la virulencia de *P. gingivalis* y la regulación de los niveles de survivina.

En resumen, los antecedentes planteados indican que:

- La periodontitis es un proceso inflamatorio de las estructuras de soporte del diente. En su etiología están involucradas variadas especies de bacterias Gram negativo, y entre ellas, *P. gingivalis* es clave en el establecimiento y progresión de la enfermedad.

- *P. gingivalis* es capaz de infectar GECs e inhibir la apoptosis de éstas.
- La apoptosis en GECs es modulada por proteínas pro- y anti-apoptóticas, entre ellas la proteína inhibidora de apoptosis survivina.
- Existen antecedentes contradictorios que sugieren que survivina podría modular la apoptosis en GECs infectadas por *P. gingivalis*; sin embargo, aún no hay resultados concluyentes al respecto.
- Datos previos sugieren que a mayor virulencia de *P. gingivalis*, mayor podría ser su eficiencia en la inhibición de la apoptosis de la línea celular OKF6/TERT2. No obstante, no se ha determinado si la modulación de survivina estaría relacionada con la virulencia de *P. gingivalis* y su capacidad de modular apoptosis en GECs.

De acuerdo a los antecedentes expuestos en este trabajo, planteamos la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

"La infección por *Porphyromonas gingivalis* regula los niveles de la proteína survivina y/o su transcripción en la línea celular epitelial gingival OKF6/TERT2. Esta regulación es dependiente de la virulencia de la bacteria"

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar si la infección por *P. gingivalis* modula los niveles de proteína y transcrito de survivina en la línea celular epitelial gingival OKF6/TERT2 y si esta regulación está relacionada con la virulencia de la bacteria.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Determinar si la infección de células epiteliales gingivales por diferentes cepas de *P. gingivalis* regula los niveles de survivina. Se estudiarán los niveles de la proteína survivina en células OKF6/TERT2 invadidas por dos cepas de referencia con diferente virulencia ATCC (33277 y W50), o un aislado clínico (CP3) obtenido de un paciente con periodontitis crónica severa. Los niveles de survivina se evaluarán mediante Western blot a tiempos tempranos (2 h) y tardíos (24 h) de post-invasión.

3.2.2 Evaluar si la infección de células epiteliales gingivales por diferentes cepas de *P. gingivalis* modula la transcripción de survivina. Se determinará los niveles de transcrito de survivina en células OKF6/TERT2 invadidas por las cepas de referencia 33277 y W50, o el aislado clínico CP3. Los niveles de ARNm de survivina se evaluarán mediante RT-PCR a tiempos tempranos (2 h) y tardíos (24 h) post-invasión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Instrumentos y equipos

Los instrumentos y equipos utilizados fueron: gabinete de seguridad biológica Nuair LabGard ES425; incubador de CO₂ Nuair Autoflow 8500; incubador de CO₂ LabTech LCO-265AI; baño termostático Memmert WNB7; microscopio invertido Zeiss Primo Vert; cámara de Neubauer Marienfeld; centrífuga Eppendorf 5417R; centrífuga Hettich Rotina 35R; espectrofotómetro Dynamica Halo RB-10; espectrofotómetro Thermo GENESYS 10S UV-Vis; sonicador Qsonica125; termociclador Axygen MaxyGen Gradient; equipo de electroforesis Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell; escáner de membranas LI-COR C-DIGit; cámara de electroforesis C.B.S. Scientific Mini Horizontal; sistema de fotodocumentación Gel Logic 112; fuente de poder Bio-Rad PowerPacTM Basic Power Supply; lector de placas BioTek ELx800.

4.2 Materiales

El anticuerpo primario anti-survivina se obtuvo de *R&D Systems Inc.* (Minneapolis, MN, EEUU); jarras de anaerobiosis, AnaeroGen y Brain Heart Infusion (BHI), en *Oxoid Ltd.* (Basingstoke, Hants., Inglaterra); reactivo TRIzol de *Invitrogen* (Carlsbad, CA, EEUU); gentamicina de *US biological* (Salem, MA, EEUU); inhibidor recombinante de ribonucleasas RNasin, partidores al azar, transcriptasa reversa M-MLV (M-MLV RT) y buffer de reacción M-MLV 5X de *Promega* (Madison, WI, EEUU); tripsina-EDTA de *Hyclone* (Logan, UT, EEUU); anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado a peroxidasa de *Bio-Rad* (Hercules, CA, EEUU); medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero (KSFM), pituitaria de bovino, factor de crecimiento epidermal y tampón fosfato salino (PBS), de *Gibco BRL* (Carlsbad, CA, EEUU); ADN polimerasa BIOLASE con tampón de reacción 5X, dNTPs, tampón de carga 5X, Hyperladder IV, MgCl₂ y agarosa, de *Bioline* (Londres, RU); dimetilsulfóxido (DMSO) y cloruro

de calcio, de Merck (Dasnstadt, Alemania); hemina de Calbiochem (San Diego, CA, EEUU); marcador de ácidos nucleicos GelRed de Phenix (Candler, NC, EEUU); placas de cultivo de 60 mm, placas de cultivo de 6 pocillos y pipetas serológicas se adquirió de BD Falcon™ (Franklin Lakes, NJ, EEUU); ADNasa I libre de ARNasa se obtuvo de Epicentre Biotechnologies (Madison, WI, EEUU); menadiona, metronidazol, leupeptina, benzamidina, ortovanadato de sodio (OVA), IGEPAL-CA-630 y el anticuerpo primario anti β -actina, se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EEUU); fluoruro de fenilmetilsulfonino (PMSF) se adquirió de OmniPur (Gibbstown, NY, EEUU); rojo Ponceau, Tween 20, alcohol isopropílico, metanol, dietilpirocarbonato (DEPC), TEMED y dodecilsulfato de sodio (SDS), se adquirieron de Winkler Ltda. (Santiago, Chile); penicilina-estreptomicina de Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd. (Kibbutz Beit-Haemek, Israel); reactivo BCA, marcador molecular Page Ruler, membrana de nitrocelulosa y sustrato ECL, se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU).

4.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos cepas de referencia de *P. gingivalis*: ATCC 33277 y W50. La cepa 33277 fue adquirida de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) y la cepa W50 fue amablemente donada por el Dr. Joe Aduse Opoku, Centro de Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Instituto Blizard, RU. Estas cepas poseen diferencias en dos importante factores de virulencia: W50 posee cápsula (antígeno K) y carece de fimbria mayor, mientras que 33277 presenta fimbria mayor y carece de cápsula (van Winkelhoff et al., 1993). Además, se utilizó un aislado clínico proveniente de una muestra subgingival obtenida de un paciente con periodontitis crónica severa (CP3). Esta muestra fue tomada por el Dr. Nicolás Dutzan en la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile luego de la firma de un consentimiento informado. En este paciente se evaluó 108 sitios periodontales que presentaron un nivel de inserción clínica (NIC)

promedio de 4.23 mm y 47 sitios con un NIC \geq 5 mm, que corresponden al 43.51% de los sitios totales. El aislado clínico CP3 presenta además características relacionadas con una alta virulencia, como presencia de cápsula, gran capacidad de formación de biopelículas y mayor invasividad en células epiteliales gingivales (Tabla 1). Además, CP3 produce un gran aumento en la viabilidad de células OKF6/TERT2, seguida por W50 y finalmente, 33277, que no aumenta la viabilidad de estas células (Bugueño, 2014; González, 2013).

	W50	33277	CP3
Cápsula	si	no	si
Fimbria	no	si	no
Aumento de viabilidad de GECs	+	-	+++
Formación de biopelícula	+	+	+++
Hidrofobicidad superficial	+	++	+++
Capacidad de invadir GECs	+	+	+++

Tabla 1. Características de cepas de *P. gingivalis* utilizadas. Se muestran las características individuales de cada cepa, como la presencia de cápsula, presencia de fimbria, capacidad de aumentar la viabilidad de GECs, capacidad de formar biopelícula, hidrofobicidad superficial y capacidad de invadir GECs. "-" indica que no provoca el efecto indicado, "+" indica un efecto o característica leve, "++" indica un efecto o característica moderada, "+++" indica un efecto o característica prominente. (tabla basada en resultados de Bugueño, 2014 y González, 2013).

4.3.1 Condiciones de cultivo bacteriano

Todas las cepas de *P. gingivalis* se sembraron en placas de agar sangre suplementado con hemina y menadiona al 1% y se cultivaron en anaerobiosis a 37°C durante 7 días hasta que las colonias presentaron pigmentación. Para crecer *P. gingivalis* en medio de cultivo líquido, se tomó colonias aisladas desde la placa de agar sangre y se resuspendieron en un tubo de ensayo con

BHI suplementado con hemina y menadiona al 1%. El tubo se incubó en anaerobiosis durante aproximadamente 24 h, hasta que las bacterias alcanzaron la fase exponencial de crecimiento (DO_{600} de 0,6-0,8).

Para generar un ambiente libre de oxígeno se utilizó jarras de anaerobiosis en las que se mantuvo los cultivos junto a un generador de anaerobiosis (AnaeroGen). Se genera un ambiente compuesto de 9-13% de dióxido de carbono, menos del 1% de oxígeno y ya que es una reacción en seco, no genera hidrógeno.

4.4 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de epitelio gingival OKF6/TERT2 (Dickson et al., 2000), facilitada por la Dra. Anna Dongari-Bagtzoglou, Escuela de Medicina Dental, Universidad de Connecticut, EEUU. Adicionalmente, se utilizaron dos líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano DLD-1 y HT-29, ambas facilitadas por el Dr. Andrew Quest, Laboratorio de Comunicaciones Celulares, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.4.1 Condiciones de cultivo celular

Las células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂ ambiental en medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero (KSFM), suplementado con pituitaria de bovino 25 µg/mL, factor de crecimiento epidermal 0,2 ng/mL, cloruro de calcio 0,3 M y penicilina/estreptomicina. Las líneas celulares cancerígenas DLD-1 y HT-29 se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con penicilina/estreptomicina 100 IU/mL y un 10% de suero fetal bovino.

Las células se mantuvieron rutinariamente entre 30 a 80% de confluencia. Para traspasar las células o generar monocapas para ensayos de infección, las monocapas se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), se agregó 1 mL de tripsina-EDTA y se incubaron durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregó

5 mL de PBS para diluir la tripsina y las células se soltaron mecánicamente de la placa mediante pipeteo o utilizando un raspador para células en caso de ser necesario. Esta suspensión se centrifugó a 940 x g durante 10 min, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de medio celular sin antibiótico.

De la suspensión se tomó una alícuota de 200 µL, se mezcló en una relación de 1:1 con solución azul tripán y se realizó el conteo células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido.

4.5 Protocolo de infección de células con *P. gingivalis*

Se sembró 4 millones de células en placas de cultivo de 60 mm para los ensayos de Western blot (WB), o 1,5 millones de células por pocillo en placas de 6 pocillos para ensayos de Transcripción Reversa (RT). En ambos casos, las placas se incubaron a 37°C en 5% CO₂ durante 24 h con medio KSFM suplementado como se describió en 4.4.1, pero sin los antibióticos penicilina/estreptomicina. Luego de este tiempo, se lavaron para ser infectadas con *P. gingivalis*.

Por otra parte, se inició un cultivo líquido de *P. gingivalis* sembrando 3-5 colonias en medio BHI suplementado y se incubó durante aproximadamente 24 h a 37°C en anaerobiosis llegando a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Luego, se tomó el volumen necesario para infectar las células epiteliales a una multiplicidad de infección (MOI) de 100, considerando que una DO₆₀₀=0,6 contiene aproximadamente 1x10⁸ UFC/mL. Finalmente, se completó el volumen de la placa con KSFM suplementado, pero sin antibióticos. Como control negativo, se utilizó células sin infectar.

Las células se infectaron durante 90 min a 37°C y 5% de CO₂. Luego, fueron lavadas con PBS y se les restituyó el medio celular suplementado con gentamicina 300 µg/mL y metronidazol 200 µg/mL para eliminar las bacterias

que no hayan ingresado a la célula. Este es considerado el "tiempo 0" y desde este punto las células se incubaron por 2 o 24 h, que corresponde a tiempos tempranos y tardíos post-invasión, respectivamente.

4.6 Análisis de la proteína survivina mediante SDS-PAGE Western blot

Para evaluar los cambios en los niveles de la proteína survivina en células OKF6/TERT2, en el desarrollo de esta Memoria se estandarizó el protocolo según se describe en los puntos 4.6.1 y 4.6.2.

4.6.1 Extracción de proteínas

Luego de transcurridas 2 y 24 h post-invasión, las células se lavaron con PBS y se les agregó 1,5 mL de PBS con los inhibidores de proteasas Leupeptina 5,5 ng/mL, Antipaina 2,2 ng/mL, Benzamidina 11 ng/mL, PMSF 1 mM y el inhibidor de fosfatasa OVA 1 mM. Con ayuda de un raspador para células se arrastró las muestras a un tubo Eppendorf que luego se centrifugó a 3800 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de solución tampón que contenía inhibidores de proteasas y los detergentes SDS al 1% (p/v) e IGEPAL al 0,5% (v/v). Luego, cada muestra fue sonicada 4 veces por 10 s con una intensidad o amplitud de un 40%, respecto a la capacidad del sonicador. Se realizó una centrifugación a 17900 x g por 1 min, se descartó el detrito celular y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el reactivo BCA de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

4.6.2 Western blot

Para la separación electroforética, 30 µg de extracto proteico fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%, durante 30 min a 70 Volts y luego 35 min a 130 Volts. Se utilizó *Page Ruler* como marcador de peso molecular. Tras la separación se realizó la transferencia desde el gel a una membrana de nitrocelulosa a 100 Volts durante 75 min en tampón Tris-glicina

frío con metanol al 20%. Para corroborar el éxito de la transferencia, se incubó la membrana con solución de rojo Ponceau al 0,1% durante 5 min, luego se lavó con agua destilada y se observó que el perfil proteico fuera nítido y que no hubiera presencia de burbujas.

A continuación, utilizando PBS-Tween 20 0,1% (v/v) se hizo una solución con leche descremada al 5% (p/v), y con esta se bloqueó la membrana durante 1 h con agitación suave. En seguida, la membrana fue incubada a 4°C con agitación suave durante toda la noche con el anticuerpo primario contra survivina (dilución 1:3000) o contra β -actina (dilución 1:5000) diluido en PBS-Tween 20 con leche descremada al 5% (p/v). A continuación, se realizó 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-Tween 20 y agitación suave, seguidos de una incubación de 90 min con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:3000) diluido en PBS-Tween 20. Finalmente, la membrana se reveló utilizando sustrato ECL de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La imagen se capturó en un sistema LI-COR C-DIGit Blot Scanner y se calculó la densitometría mediante el software Image Studio-Lite versión 3.1, normalizando al valor 1 el control sin infección.

4.7 Análisis transcripcional de survivina

Para el análisis transcripcional de survivina en células OKF6/TERT2, en esta Tesis se estandarizó el protocolo descrito en los puntos 4.7.1, 4.7.2 y 4.7.3.

4.7.1 Extracción de ARN

Una vez transcurridos 2 y 24 h post-invasión, el ARN total se aisló agregando 1,5 mL de reactivo TRIzol por pocillo y procediendo de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se homogenizó la muestra y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en tubos Eppendorf. Luego, se agregó 200 μ L de cloroformo por muestra, se agitó 15 s y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente, esto seguido de una

centrifugación a 12000 x g por 15 min a 4°C, separando así la fase orgánica de la acuosa. Se tomó 250 µL de la fase acuosa en un tubo nuevo y se agregó 750 µL de isopropanol para precipitar el ARN. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante, el sedimento se lavó con 1 mL de etanol 75% y se centrifugó a 7500 x g durante 5 min a 4°C. Luego, el sedimento se secó parcialmente durante 10 min y se resuspendió en 30 µL de agua libre de ARNasas. El ARN resuspendido se incubó a 70°C por 10 min y se guardó a -20°C. Finalmente, y a modo de corroborar la integridad del ARN recién extraído, en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2% al que se le agregó reactivo GelRed 1X como tinción, las muestras se separaron electroforéticamente por 2 h a 70 Volts, donde la presencia de dos bandas nítidas correspondientes a ARN de 18S y 28S dan cuenta de la integridad del producto purificado.

Para cuantificar la concentración de los ARN obtenidos se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración según la siguiente fórmula: Concentración de ARN (µg/µL) = (A₂₆₀) x (0,04) x (factor de dilución). Considerando que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280 nm, la pureza de la muestra se determinó según la siguiente fórmula: (A₂₆₀/ A₂₈₀)~2.

4.7.2 Digestión ADN / Transcripción Reversa

Para degradar el ADN remanente de la muestra, se tomó 2 µg de ARN total y se incubó durante 15 min a 37°C con ADNasa I libre de ARNasas a una concentración de 0,5 unidades/µL. Luego se incubó a 70°C durante 10 min para inactivar la ADNasa y se enfrió en hielo inmediatamente.

Para la transcripción reversa o síntesis de ADN complementario (ADNc), se agregó 1 µL de partidores al azar 0,5 µg/µL y 1,25 µL de dNTPs 10 mM a la muestra, se calentó a 70°C por 5 min y se enfrió en hielo. Luego, se agregó 25 unidades de RNasin, 200 unidades de M-MLV RT, 1,25 µL de DMSO y 5 µL de

tampón de reacción M-MLV 5X en un volumen final de 25 µL. La mezcla se incubó durante 1 h a 42°C y luego se calentó a 70°C durante 15 min para detener la reacción.

4.7.3 Amplificación de survivina por PCR

Para la amplificación de survivina por PCR, se tomó 200 ng de ADNc o 10 ng para la amplificación de β-actina. A continuación, se realizó la reacción con las siguientes concentraciones finales: 0,5 unidades de polimerasa BIOLASE, 1X de tampón de reacción, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM dNTPs y DMSO 5% (v/v). Los partidores utilizados para detectar β-actina fueron: sentido 5'-GGAAATCGTGCGTGACATTAA-3' y anti sentido 5'-TAGTCCGCCTAGAAGCATTG-3', que generan un producto de PCR de 519 pares de bases (pb) de largo. Para amplificar survivina, se utilizaron: sentido 5'-GCACCACTTCCAGGGTTTAT-3' y anti sentido 5'-CAGACGCTTCCTATCACTCTATTC-3', los cuales generan un producto de PCR de 705 pb de largo.

Para ambas reacciones, el protocolo de amplificación constó de una desnaturación inicial de 2 min a 95 °C; 30 amplificaciones que consistieron en pasos consecutivos de 30 s de desnaturación a 95 °C, 1 min a 55 °C y un min a 72 °C; y finalmente, una última extensión de 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel al de agarosa al 1%, corrido a 70 Volts por 120 min.

5. RESULTADOS

5.1 Niveles proteicos de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos y tardíos post-invasión por *P. gingivalis* 33277, W50 o CP3

Con el fin de determinar si la invasión de *P. gingivalis* genera un efecto en los niveles de la proteína survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2, se realizó WB utilizando β -actina como proteína de referencia y células sin infectar como control. Esta técnica tuvo que ser montada y estandarizada como parte de esta Memoria.

Los primeros WB se hicieron utilizando células OKF6/TERT2 y líneas celulares cancerígenas (DLD-1 y HT-29) como control positivo para survivina ya que está reportado que estas líneas poseen altos niveles de la proteína en estado basal. En primer lugar, se ajustó la cantidad de células sembradas en las placas de 60 mm, niveles y duración de los ciclos de sonicación al hacer el extracto proteico y los tiempos de transferencia. En una segunda instancia se ajustaron condiciones de bloqueo y cantidad de proteína a cargar por pocillo. Finalmente, se estandarizó la dilución tanto para los anticuerpos primarios contra survivina y contra β -actina, así como para el anticuerpo secundario.

La invasión se llevó a cabo utilizando 3 cepas de la bacteria con diferente virulencia: la cepa de referencia W50 (altamente virulenta), la cepa 33277 (menos virulenta) o el aislado clínico CP3, obtenido de un paciente con periodontitis crónica con un alto grado de severidad, la cual es más virulenta que ambas cepas de referencia (Tabla 1). La invasión se realizó de acuerdo a lo descrito en 4.5. Luego de la incubación durante 2 o 24 h, se realizó la extracción de proteínas totales. Las muestras se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron bloqueadas y posteriormente

incubadas con los anticuerpos contra survivina y β -actina. El análisis posterior se hizo mediante cuantificación relativa, utilizando β -actina como control de carga y células sin invadir como control negativo.

Como se puede observar en la Figura 3, a tiempos tempranos post-invasión se observa que los niveles de survivina en células epiteliales gingivales invadidas con las distintas cepas de *P. gingivalis* (W50, 33277 y CP3) no presentó diferencias significativas respecto al control sin infectar.

En contraste, a tiempos tardíos (24 h) post-invasión por *P. gingivalis*, sí se observaron cambios en los niveles de la proteína, cambios que fueron diferentes dependiendo de la cepa (Figura 4). La invasión con la cepa de referencia W50 no generó variación en los niveles de survivina respecto al control sin infección. En cambio, la cepa de referencia 33277 provocó una disminución en los niveles de survivina de más de un 50% respecto al control sin invasión. Por su parte, el aislado clínico CP3, provocó una disminución en los niveles de survivina por sobre un 80% respecto al control sin infectar.

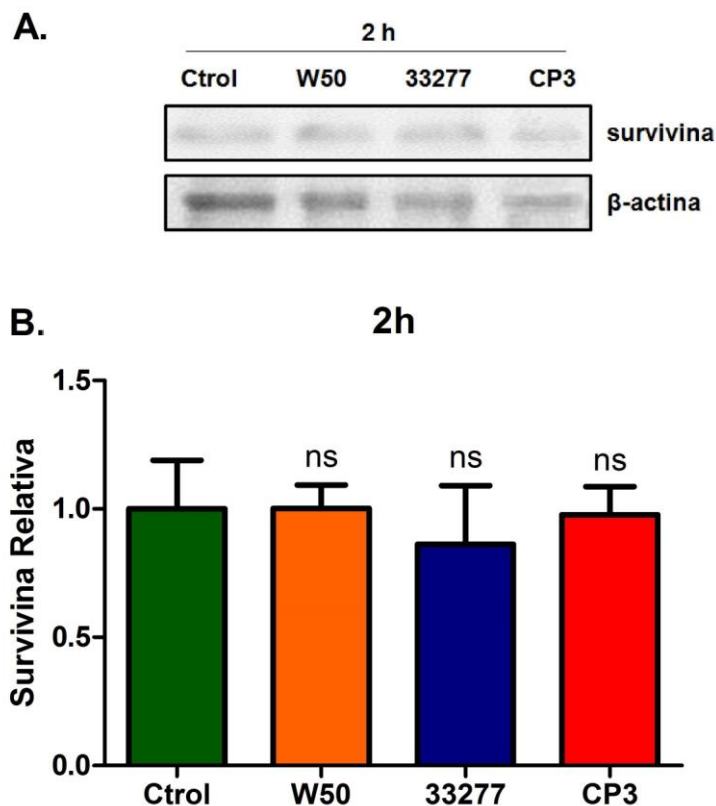


Figura 3. Efecto de cepas de *P. gingivalis* W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2 h) post-invasión. A. Western blot contra survivina y el control de carga β -actina. Se muestra el nivel de proteínas en células sin infectar (Ctrl) y en células OKF6/TERT2 infectadas con las diferentes cepas de *P. gingivalis*. En este ensayo en particular se observa que el nivel de β -actina se encuentra alto en el Ctrl respecto al resto de las condiciones, pero hay que mencionar que se trata de un caso particular del total de repeticiones. **B.** Cuantificación relativa de survivina normalizada con β -actina. El control fue normalizado a 1. "ns" indica valores no significativos respecto al control, considerando un valor $p > 0,05$. ($n=3$). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), y post-test Dunnett.

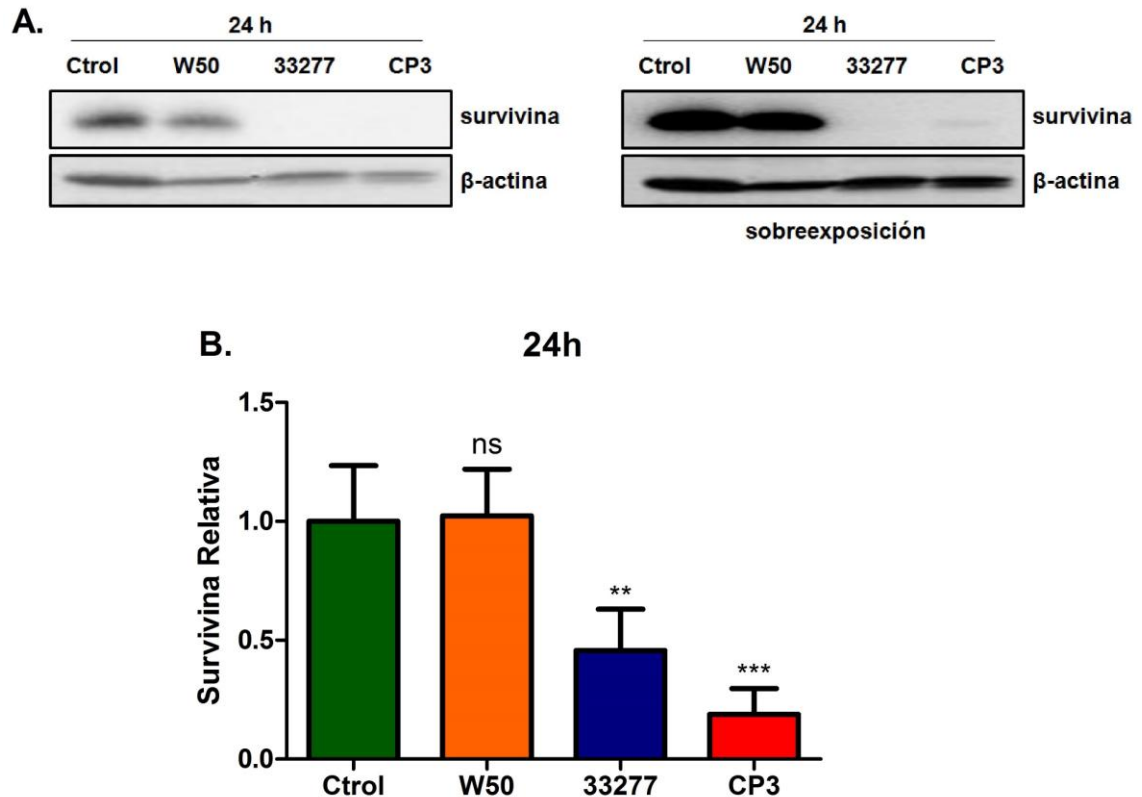


Figura 4. Efecto de cepas de *P. gingivalis* W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tardíos (24 h) post-invasión. A. Western blot contra survivina y el control de carga β -actina. Se observan el control sin infección (Ctrl) y las células OKF6/TERT2 infectadas con las diferentes cepas de *P. gingivalis*. Se observa que los niveles de survivina de 33277 son más bajos que el promedio obtenido del total de repeticiones, cabe mencionar que se trata de un hecho aislado respecto al total de ensayos realizados. **B.** Cuantificación relativa de survivina normalizada con β -actina. El control fue normalizado a 1. ** indica diferencias significativas respecto al control considerando un valor de $p < 0,01$, *** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,005$ y "ns" indica valores no significativos considerando un valor $p > 0,05$ ($n=4$). Se realizó el test estadístico ANOVA y post-test Dunnett.

5.2 Niveles de transcrito de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos y tardíos tras la invasión de *P. gingivalis* 33277, W50 o CP3

Para determinar si los cambios en los niveles de survivina producidos en respuesta a la invasión por *P. gingivalis* se deben a una regulación a nivel transcripcional, se evaluó los niveles de ARNm de la proteína mediante RT-PCR.

El trabajo realizado en esta Memoria incluyó montar esta técnica en el laboratorio y estandarizarla para cuantificar el transcrito de survivina. En un inicio, se determinó la cantidad necesaria de células a sembrar con el fin de lograr una confluencia de 80% en placas de 6 pocillos luego de 24 h de cultivo. Tras la invasión y tratamiento con antibióticos se corroboró que la extracción de ARN total no afectara la integridad del ARNm ni presentara parámetros de pureza bajo lo requerido. Posteriormente, se determinó que era necesario un tratamiento con ADNAsas a la muestra de ARNm total, ya que la muestra presentaba amplificación por PCR previo a la transcripción reversa (RT) (datos no mostrados). Luego, se estandarizó la RT, seleccionando los partidores y transcriptasa reversa que mejor se ajustaba a nuestras condiciones. Posteriormente, se estandarizó la reacción de PCR. Para esto, primero se ajustó la temperatura de alineamiento mediante un gradiente. Luego, se probaron distintas cantidades de ADNc en la reacción y se determinó el rango de ciclos de PCR en que el producto de PCR presenta un aumento exponencial para cada partidador (Figura 7) y se determinó utilizar 30 ciclos de PCR para ensayos posteriores. Finalmente, se realizaron ajustes para mejorar la reproducibilidad de la técnica, entre estos, se determinó que es indispensable el uso de DMSO al 5% tanto en la reacción de RT como en la de PCR.

Se realizó la invasión de células OKF6/TERT2 como se describió previamente, utilizando las cepas de referencia 33277 y W50 o el aislado clínico CP3. Tras la

invasión, cada muestra se incubó durante 2 h para tiempos tempranos o 24 h para tiempos tardíos en presencia de gentamicina/metronidazol. Luego, se realizó la extracción de ARN, digestión de ADN contaminante y transcripción reversa. A continuación, se realizó la amplificación para los dos mensajeros: β -actina como control interno y survivina. Finalmente, se realizó la separación electroforética de las muestras en geles de agarosa al 1% y su posterior cuantificación densitométrica.

Los resultados mostrados en la Figura 5 indican que ya a tiempos tempranos (2 h) post-infección se observa una disminución en el transcrito de survivina respecto al control de células sin infectar. Esta disminución fue de un 60% aproximadamente en células invadidas respecto al control sin infectar e independiente de la cepa de *P. gingivalis* utilizada, ya que tanto las dos cepas de referencia (W50 y 33277) como el aislado clínico CP3 tuvieron el mismo efecto (Figura 5).

Si bien estos resultados no concuerdan con los resultados observados en el WB (Figura 3), donde no observamos una disminución en los niveles de la proteína a este tiempo de infección, podemos especular que la mantención en los niveles proteicos puede deberse a mecanismos gatillados en las células OKF6/TERT2, como por ejemplo alteraciones en la vida media de la proteína. Estos mecanismos podrían ser inducidos para mantener la viabilidad celular en respuesta a la invasión por parte del patógeno.

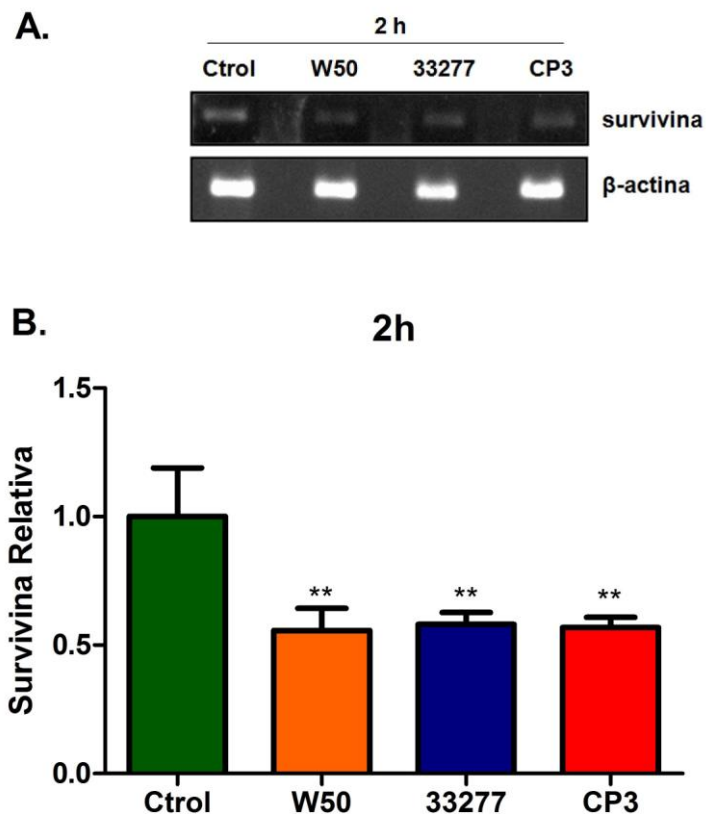


Figura 5. Efecto de cepas de *P. gingivalis* W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de ARN mensajero de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2 h) post-invasión. A. Electroforesis en gel de agarosa representativa de los amplificadores de survivina y el control β -actina. Se muestran los niveles de ambos transcritos en células OKF6/TERT2 infectadas por 2 h con las tres cepas de *P. gingivalis* y el control sin infección (Ctrol). **B.** Cuantificación relativa del transcrito de survivina normalizada por el transcrito de β -actina. Se asignó arbitrariamente el valor 1 al control de las células sin infectar. ** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,01$ ($n=3$). Se realizó el test estadístico ANOVA, y post-test Dunnett.

En tanto, a tiempos tardíos (24 h) post-invasión se observó diferencias dependientes de la cepa en los niveles del mensajero de survivina en células infectadas respecto a las células sin infectar (Figura 6). La cepa W50 no generó diferencias significativas en los niveles del mensajero respecto al control. En cambio, la cepa 33277 provocó una disminución de aproximadamente un 50% en los niveles de survivina respecto a células sin infectar. Por último, el aislado clínico CP3 presentó la disminución más importante respecto al control sin infectar, alcanzado casi un 80% de disminución en los niveles del transcrito de survivina en relación al control sin infectar.

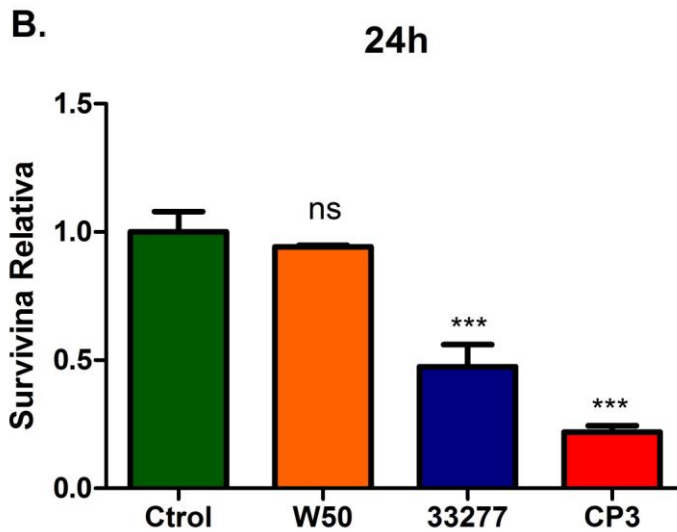
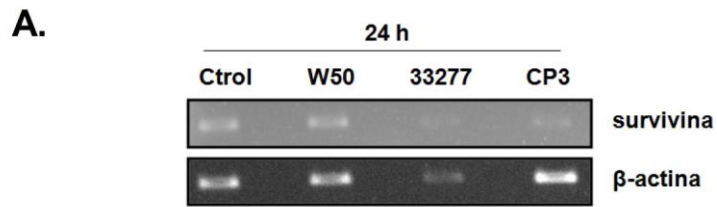


Figura 6. Efecto de cepas de *P. gingivalis* W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de ARN mensajero de survivina en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tardíos (24 h) post-invasión. A. Electroforesis en gel de agarosa representativa de los amplificadores de survivina y el control β-actina. Se muestran los niveles de ambos transcritos en células OKF6/TERT2 infectadas por 24 h con las tres cepas de *P. gingivalis* y el control sin infección (Ctrol). **B.** Cuantificación relativa del transcrito survivina normalizada por el transcrito de β-actina. Se asignó arbitrariamente el valor 1 al control de las células sin infectar. "ns" indica valores no significativos respecto al control. *** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,001$ ($n=3$). Se realizó ANOVA y post-test Dunnett.

6. DISCUSIÓN

El objetivo general de este estudio fue evaluar si la infección por *P. gingivalis* modula los niveles de proteína y transcrito de survivina en la línea de GECs OKF6/TERT2, y si esta regulación está relacionada con la virulencia de la bacteria

En primer lugar, es importante mencionar que los estudios previos donde se sugiere una participación de survivina en la inhibición de apoptosis de células epiteliales gingivales utilizan células de cultivo primario (Dickinson & Moffatt, 2011; Mao et al., 2007; Urnowey et al., 2006; Yilmaz et al., 2008). Este tipo de cultivos, si bien corresponden a un modelo fisiológico más cercano a las células que las originaron en comparación a una línea celular inmortalizada, tiene la desventaja de que posee mucha variabilidad debido a que las células son extraídas de distintos pacientes. Las diferencias inherentes a cada individuo en relación a su genoma, microbioma y estado fisiológico, entre otros, puede generar diferencias importantes en las proteínas expresadas, sobre todo aquellas proteínas que tienen directa relación con la regulación del ciclo celular y apoptosis, como survivina. Por lo demás, muchas veces en estos estudios los parámetros clínicos de los pacientes que son reclutados para obtener los tejidos no están definidos claramente, lo cual puede contribuir aún más a la variabilidad de los resultados. Por estas razones, pensamos que utilizar una línea celular inmortalizada proveniente de tejido gingival humano es una mejor alternativa para este tipo de análisis.

En el primer objetivo se determinó los niveles proteicos de survivina en células OKF6/TERT2 a tiempos tempranos y tardíos post-invasión con *P. gingivalis*; se utilizaron las cepas de referencia 33277, W50 y un aislado clínico de paciente con periodontitis crónica severa, denominado CP3. Los resultados obtenidos indican que a tiempos tempranos (2 h) post-invasión no existen variaciones en los niveles de survivina, independiente de la cepa de *P. gingivalis* utilizada.

Esto varía a tiempos tardíos (24 h) ya que, si bien la infección por la cepa W50 no generó cambios en los niveles de survivina, sí se observó una disminución en células infectadas con las cepas 33277 y el aislado CP3 (Figura 4). Estos resultados se contradicen con resultados previos realizados en el laboratorio, donde células OKF6/TERT2 infectadas por la cepa W50 presentan una marcada disminución en los niveles de apoptosis a 24 h post-invasión, mientras que la misma línea celular infectada con la cepa 33277 presenta una disminución moderada en los niveles de apoptosis también a tiempos tardíos.

En el segundo objetivo de este trabajo demostramos que *P. gingivalis* induce una disminución temprana (2 h) en los niveles del transcrito de survivina en células epiteliales OKF6/TERT2 (Figura 5). Esta disminución resultó ser independiente de la cepa utilizada, ya que W50, 33277 y CP3 disminuyeron los niveles del ARNm de survivina aproximadamente un 60%. Sin embargo, a tiempos tardíos post-invasión (24 h) la respuesta a la infección es diferente y depende de la cepa utilizada (Figura 6). Interesantemente, a tiempos tardíos, la disminución en el transcrito de survivina se correlaciona con una disminución en los niveles de proteína. Así, los niveles de ARNm para la cepa W50 no cambiaron, pero sí hubo una disminución en las células infectadas con la cepa 33277 y CP3.

A modo de analizar la temporalidad de nuestros resultados, primero determinamos si existen diferencias significativas en los niveles de transcrito o proteína entre tiempos tempranos y tardíos en las células sin infectar (control). Para esto se utilizó la razón entre los valores obtenidos de las densitometrías de survivina sobre los de β -actina, tanto para los datos de Western blot como para los de RT-PCR (Figura 8). Los resultados nos muestran que los niveles de proteína de células sin infectar no varían significativamente entre tiempos tempranos y tardíos de incubación (Figura 8A). Por el contrario, se observa que el mensajero aumentó significativamente (2,03 veces) entre tiempos tempranos

y tardíos de incubación en células sin infección (Figura 8B). Debido a este resultado, analizamos los niveles de transcrito sin normalizar respecto al control, comparando tiempos tempranos y tardíos de incubación, tanto para células infectadas como para el control respectivo (Figura 9).

Al analizar las variaciones del ARNm de survivina a través del tiempo observamos diferencias significativas de acuerdo a la cepa de *P. gingivalis* utilizada. Tras la invasión con la cepa W50 existe una disminución temprana del transcrito survivina (Figura 5B) que no sería suficiente ni sostenida como para provocar una disminución de la cantidad de proteína respecto al control (Figura 3B). De hecho, luego de 24 h de infección el transcrito aumenta y se equipara a los niveles del control (Figura 9A). En las células infectadas con la cepa 33277 también se observa una disminución temprana del transcrito de survivina que es insuficiente para generar cambios en los niveles de la proteína. Sin embargo, a diferencia de la cepa W50, a tiempos tardíos se mantiene una disminución en los niveles del transcrito de survivina (Figura 9B) que sí se correlaciona con una disminución en los niveles de la proteína. Por último, el efecto que produce la cepa CP3 sobre los niveles de survivina y su transcrito es similar al producido por la cepa 33277, aunque el efecto es aproximadamente 30% mayor. En las células infectadas con el asilado CP3, se observa una disminución temprana en el transcrito de survivina insuficiente para alterar los niveles de proteína. Sin embargo, cuando los niveles de transcrito se mantienen bajos hasta tiempos tardíos (Figura 9C), la cantidad de proteína también disminuye.

Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la apoptosis en células epiteliales gingivales mediada por *P. gingivalis* no se debería a un cambio en los niveles de la proteína survivina. Por el contrario, aún cuando la bacteria provoca una disminución en la apoptosis, survivina disminuye sus niveles de expresión. En segundo lugar, la disminución en los niveles de la proteína

survivina ocurriría a tiempos tardíos de infección. Esta disminución se debería, en parte, a un mecanismo transcripcional dependiente de la mantención de bajos niveles del ARNm durante la infección.

El análisis de la literatura nos permite especular sobre qué mecanismos podrían estar involucrados en esta regulación. Takeuchi et al. (2013) describieron que la serina fosfatasa SerB producida por *P. gingivalis* 33277 desfosforila la subunidad p65 en el residuo asociado a exportación S563 y evita la translocación del factor transcripcional NF-κB en células epiteliales. Esta disminución en la translocación y consecuente inactividad de NF-κB podría explicar la disminución del ARNm de survivina en células OKF6/TERT2 infectadas con la cepa 33277 y probablemente también con el aislado CP3, como se ha observado en este trabajo. Sin embargo, no existen estudios relacionando SerB producida por la cepa W50 o el aislado CP3 y la translocación de NF-κB.

Por otro lado, podría existir una regulación de la apoptosis dependiente de la liberación de la porción mitocondrial de survivina, fenómeno descrito por Dohi et al. (2004). En este trabajo se demuestra que una porción mitocondrial de survivina, al liberarse al citoplasma, actúa como inhibidor de apoptosis estabilizando proteínas anti-apoptóticas como XIAP y consecuentemente inhibiendo la activación de caspasas. Este antecedente nos habla de un mecanismo mediante el cual survivina inhibe la apoptosis de una forma independiente a su expresión y al relacionarlo con los resultados de nuestro trabajo, podría explicar que exista una disminución en los niveles totales de survivina y aún así observar un aumento en la sobrevivencia en GECs a tiempos tardíos tras la infección por *P. gingivalis*, como es el caso del aislado CP3. Es importante hacer notar que para que esta conjetura sea consistente con nuestros resultados la liberación de survivina desde la mitocondria no tendría que ser mediada por un aumento en la permeabilidad de la membrana externa

de la mitocondria, ya que un aumento en la permeabilidad se asocia con una disminución en su potencial de membrana, y por consecuencia, con una disminución en su actividad. Esto sería contradictorio con nuestros ensayos previos de viabilidad celular utilizando el método de MTS, donde observamos un aumento en los niveles de actividad mitocondrial a tiempos tardíos en células infectadas con *P. gingivalis* respecto al control sin infectar (González 2013).

Otro mecanismo de regulación de apoptosis mediado por survivina, pero independiente de su expresión, podría ser a través de un aumento en su exportación desde el núcleo hacia el citoplasma, donde ejerce su actividad anti-apoptótica compensando así su menor expresión mediante mayores niveles de survivina citoplasmática. Esta explicación coincide con antecedentes expuestos por Colnaghi et al. (2006), donde se demuestra que la exportación de survivina por parte de la exportina-1 (Crm-1) es necesaria para su posterior acción anti-apoptótica en el citoplasma.

En relación a las cepas utilizadas, es importante notar que la modulación de survivina varió dependiendo de cuál se ensayó, siendo el aislado CP3 el que presentó una mayor disminución de survivina tanto a nivel de ARNm como de proteína. Por su parte, la cepa 33277 también fue capaz de disminuir la expresión de survivina, aunque en menor grado que el aislado CP3. Finalmente, la disminución que generó la cepa W50 en el ARNm de survivina no fue suficiente para disminuir los niveles de la proteína.

Estos resultados se podrían correlacionar con las diferencias en ciertos factores de virulencia presentes en cada una de las cepas. Por ejemplo, datos previos obtenidos en el laboratorio muestran que la cepa 33277 y más aún el aislado CP3, tienen una alta capacidad de formar biopelículas (Tabla 1). Además, ambas cepas poseen una mayor hidrofobicidad superficial que la cepa W50. Como ambas características se relacionan con propiedades

superficiales de la bacteria, podrían influir en su interacción con la célula hospedera, autoagregación y con la capacidad de invadir GECs.

Con el fin de integrar las ideas previamente expuestas, presentamos a continuación un modelo que pretende explicar los resultados observados en el desarrollo de esta Memoria (Figura 10). La línea celular OKF6/TERT2, tras ser infectada por *P. gingivalis*, gatilla mecanismos compensatorios a tiempos tempranos mediante los cuales pretende protegerse de la infección. Estos mecanismos serían independientes de la cepa de *P. gingivalis* utilizada y lograrían mantener los niveles de la proteína survivina sin variaciones en comparación al control incluso cuando, presuntamente por la acción de la enzima SerB de *P. gingivalis*, se vean disminuidos los niveles del transcrito de survivina. A tiempos tardíos, la disminución en los niveles de transcrito y proteína survivina son aparentemente dependientes de factores de virulencia de *P. gingivalis*, estando involucrados factores como la capacidad de formar biopelículas, la hidrofobicidad superficial y la capacidad invasiva. Sin embargo, la disminución en los niveles de survivina total no estarían relacionados con la viabilidad de las células hospederas. Pensamos que esto puede deberse a mecanismos compensatorios mediante los cuales las células OKF6/TERT2, o incluso *P. gingivalis*, mantienen la actividad de survivina en el tiempo independientemente de su baja expresión, por ejemplo, aumentando su translocación desde el núcleo o desde la mitocondria hacia el citoplasma donde produce su efecto anti-apoptótico, o incluso, aumentando su vida media. De esta forma, se evitaría que la disminución en los niveles de survivina afecten la viabilidad de las células hospederas.

En resumen, nuestros resultados indican que los niveles de survivina son modulados transcripcionalmente por *P. gingivalis*, lo que provocaría una disminución tardía en los niveles de la proteína en el caso de CP3 y 33277, pero no de W50. Estos resultados podrían estar relacionados con

características individuales de cada cepa, como la capacidad de formar biopelícula, la alta hidrofobicidad superficial y la capacidad invasiva. Finalmente, la modulación de survivina por parte de *P. gingivalis* no estaría relacionada con su habilidad de inhibir apoptosis en GECs.

7. CONCLUSIONES

- La infección con la cepa W50 de *P. gingivalis* produce una disminución temprana en los niveles de ARNm de survivina en la línea celular OKF6/TERT2, esta disminución se revierte a tiempos tardíos, siendo incapaz de afectar los niveles de la proteína.
- La infección con la cepa 33277 de *P. gingivalis* produce una disminución temprana en los niveles de ARNm de survivina en la línea celular OKF6/TERT2, esta disminución se sostiene en el tiempo, lo que provocaría la disminución a tiempos tardíos en los niveles proteicos de survivina.
- La infección con el aislado clínico CP3 de *P. gingivalis* obtenido de un paciente con periodontitis disminuye los niveles de ARNm de survivina en la línea celular OKF6/TERT2 a tiempos tempranos de infección. Esta disminución del transcrito se mantiene a tiempos tardíos de infección, lo que provocaría una disminución pronunciada en los niveles proteicos de survivina.
- Cambios en los niveles de la proteína survivina provocados por la infección por *P. gingivalis* se correlacionan con la regulación transcripcional de survivina a tiempos tardíos de la infección.
- Características tales como la capacidad de formar biopelícula, la hidrofobicidad superficial y la capacidad invasiva de *P. gingivalis* podrían estar relacionadas con la capacidad de modular survivina en GECs inmortalizadas.
- Si bien *P. gingivalis* modula los niveles de survivina, esta modulación no está relacionada con la capacidad de la bacteria de inhibir apoptosis en GECs inmortalizadas.

8. REFERENCIAS

- Aas, J., Paster, B., and Stokes, L. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 5721–5732.
- Bosshardt, D. D., and Lang, N. P. (2005). The junctional epithelium: from health to disease. *Journal of Dental Research*, **84**, 9–20.
- Bugueño, I. (2014). Caracterización de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* y su efecto en la viabilidad de células epiteliales gingivales. Memoria de Odontólogo. Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 92p.
- Byrne, S. J., Dashper, S. G., Darby, I. B., Adams, G. G., Hoffmann, B., and Reynolds, E. C. (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, **24**, 469–77.
- Choi, J.-I., & Seymour, G. J. (2010). Vaccines against periodontitis: a forward-looking review. *Journal of Periodontal & Implant Science*, **40**, 153–63.
- Clark, W., & Löe, H. (1993). Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology 2000*, **2**, 72–82.
- Colnaghi, R., Connell, C. M., Barrett, R. M. a, and Wheatley, S. P. (2006). Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 33450–6.
- Dickinson, B., and Moffatt, C. (2011). Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers. *Molecular Oral Microbiology*, **26**, 210–220.
- Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P., and Rheinwald, J. G. (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 1436–1447.
- Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N. R., Plescia, J., and Altieri, D. C. (2004). Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, **114**, 1117–1127.

- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., and Altieri, D. C. (2004). An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 34087–34090.
- Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzúa, I., Aranda, W., Carvajal, P., and Arteaga, O. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *The Journal of Periodontology*, **81**, 1403–1410.
- González, S. (2013). La infección por *Porphyromonas gingivalis* inhibe la apoptosis en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2. Memoria de Bioquímico. Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 43p.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., and Socransky, S. S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, **25**, 346–353.
- Hail, N., Carter, B. Z., Konopleva, M., and Andreeff, M. (2006). Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, **11**, 889–904.
- Hajishengallis, G., and Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, **27**, 409–19.
- Handfield, M., Mans, J. J., Zheng, G., Lopez, M. C., Mao, S., Progulske-Fox, A., Narasimhan, G., Baker, H. V., and Lamont, R. J. (2005). Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. *Cellular microbiology*, **7**, 811–823.
- Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagensen, J. A. J., and Molin, S. (2007). Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*, **445**, 533–536.
- Hintermann, E., Haake, S. K., Christen, U., Sharabi, A., and Quaranta, V. (2002). Discrete Proteolysis of Focal Contact and Adherens Junction Components in *Porphyromonas gingivalis*-Infected Oral Keratinocytes: a Strategy for Cell Adhesion and Migration Disabling. *Infection and Immunity*, **70**, 5846–5856.
- Inaba, H., Kawai, S., Kato, T., Nakagawa, I., and Amano, A. (2006). Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to

Porphyromonas gingivalis vesicles with different types of fimbriae. *Infection and Immunity*, **74**, 734–739.

- Jenkinson, H. F., & Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, **13**, 589–95.
- Kawada, M., Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Saito, T., Oho, T., and Koga, T. (2004). Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiology and Immunology*, **19**, 289–292.
- Kinane, D. F., Galicia, J. C., Gorr, S.-U., Stathopoulou, P. G., and Benakanakere, M. (2008). *P. gingivalis* interactions with epithelial cells. *Frontiers in Bioscience*, **13**, 966–84.
- Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1244–63.
- Lamont, R., & Jenkinson, H. (2000). Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, **15**, 341–349.
- Li, Q., Pan, C., Teng, D., Lin, L., Kou, Y., Haase, E. M., Scannapieco, F. a, and Pan, Y. (2014). *Porphyromonas gingivalis* modulates *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis of respiratory epithelial cells through the STAT3 signaling pathway. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **16**, 17–27.
- Loesche, W. J., & Grossman, N. S. (2001). Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic , Infection : Diagnosis and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, 727–752.
- Madianos, P. N., Papapanou, P. N., Nannmark, U., Dahlén, G., and Sandros, J. (1996). *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infection and immunity*, **64**, 660–664.
- Mao, S., Park, Y., Hasegawa, Y., Tribble, G. D., James, C. E., Handfield, M., Stavropoulos, M. F., Yilmaz, O., and Lamont, R. J. (2007). Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology*, **9**, 1997–2007.

- McKee, A., & McDermid, A. (1986). Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infection and Immunity*, **52**, 349–355.
- Morin, P. J. (1999). beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, **21**, 1021–30.
- Nakhjiri, S. F., Park, Y., Yilmaz, O., Chung, W. O., Watanabe, K., El-Sabaeny, A., Park, K., and Lamont, R. J. (2001). Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, **200**, 145–149.
- Papapanou, P. N., Sandros, J., Lindberg, K., Duncan, M. J., Niederman, R., and Nannmark, U. (1994). *Porphyromonas gingivalis* may multiply and advance within stratified human junctional epithelium in vitro. *Journal of Periodontal Research*, **29**, 374–375.
- Petersen, P., & Bourgeois, D. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*, **83**, 661–669.
- Salminen, A., Gursoy, U. K., Paju, S., Hyvärinen, K., Mäntylä, P., Buhlin, K., Könönen, E., Nieminen, M. S., Sorsa, T., Sinisalo, J., and Pussinen, P. J. (2014). Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, **41**, 442–50.
- Shah, H. N., & Collins, M. D. (1988). Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **38**, 128–131.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, **38**, 135–87.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., and Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, **25**, 134–144.
- Sun, C., Nettlesheim, D., Liu, Z., and Olejniczak, E. (2005). Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry*, **44**, 11–7.
- Takeuchi, H., Hirano, T., Whitmore, S. E., Morisaki, I., Amano, A., and Lamont, R. J. (2013). The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis*

suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- κ B RelA/p65. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003326.

- Tapia, J. C., Torres, V. A., Rodriguez, D. A., Leyton, L., and Quest, A. F. G. (2006). Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 15079–84.
- Tribble, G., & Lamont, R. (2010). Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology 2000*, **52**, 68–83.
- Urnowey, S., Ansai, T., Bitko, V., Nakayama, K., Takehara, T., and Barik, S. (2006). Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiology*, **6**, 26.
- Valenzuela, M., Pérez-Pérez, G., Corvalán, A. H., Carrasco, G., Urra, H., Bravo, D., Toledo, H., and Quest, A. F. G. (2010). *Helicobacter pylori*-induced loss of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin is linked to gastritis and death of human gastric cells. *The Journal of Infectious Diseases*, **202**, 1021–1030.
- Van Winkelhoff, A. J., Appelmelk, B. J., Kippuw, N., and de Graaff, J. (1993). K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiology and Immunology*, **8**, 259–265.
- Van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A., and van der Velden, U. (2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, **29**, 1023–8.
- Wang, J. H., Zhou, Y. J., and He, P. (2010). *Staphylococcus aureus* induces apoptosis of human monocytic U937 cells via NF-kappaB signaling pathways. *Microbial Pathogenesis*, **49**, 252–9.
- Yilmaz, Ö., & Jungas, T. (2004). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas*. *Infection and Immunity*, **72**, 3743–3751.

- Yilmaz, Ö., Watanabe, K., and Lamont, R. J. (2002). Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology*, **4**, 305–314.
- Yilmaz, Ö., Yao, L., Maeda, K., Rose, T. M., Lewis, E. L., Duman, M., Lamont, R. J., and Ojcius, D. M. (2008). ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. *Cellular Microbiology*, **10**, 863–75.
- Yilmaz, Ö., Young, P., Lamont, R., and Kenny, G. (2003). Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology*, **149**, 2417–2426.
- Zhao, J., Tenev, T., Martins, L. M., Downward, J., and Lemoine, N. R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science*, **113 Pt 23**, 4363–4371.

9. ANEXOS

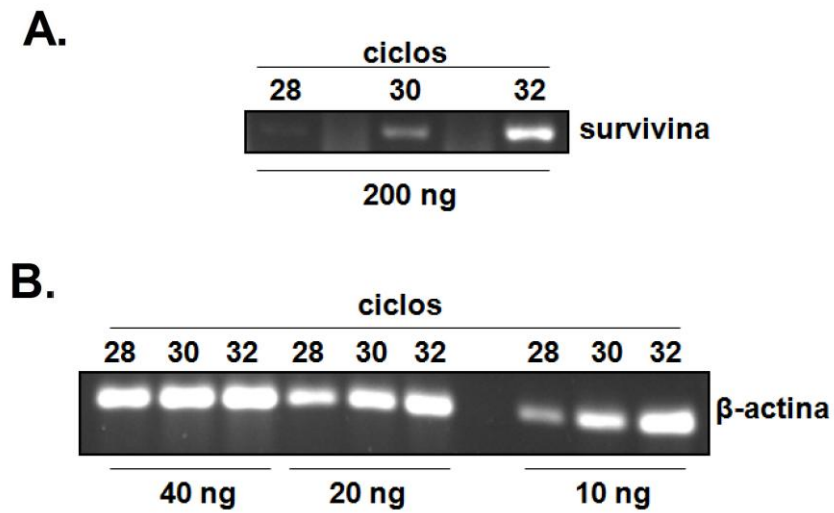


Figura 7. Estandarización de RT-PCR. A. Amplificación de 200 ng de ADNc de survivina luego de 28, 30 o 32 ciclos de PCR. **B.** Amplificación de 40, 20 o 10 ng de β -actina luego de 28, 30 o 32 ciclos de PCR.

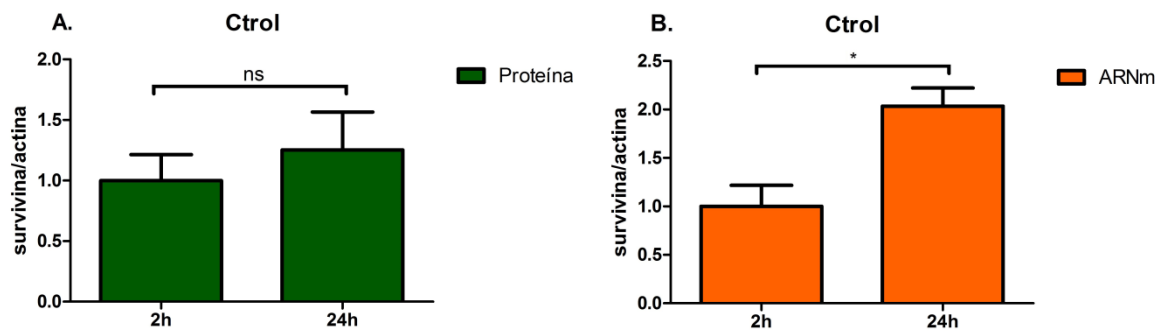


Figura 8. Variación en el tiempo de los niveles de proteína y transcrito de controles sin infectar. **A.** Se muestran los niveles de proteína sin normalizar a tiempos tempranos y tardíos del control sin infectar. **B.** Se muestran los niveles de transcrito sin normalizar a tiempos tempranos y tardíos de células sin infectar. * indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,05$, "ns" indica valores no significativos considerando un valor $p > 0,05$. Este resultado proviene de al menos cuatro experimentos independientes. Como test estadístico se realizó un t-test desapareado de dos colas con corrección de Welch.

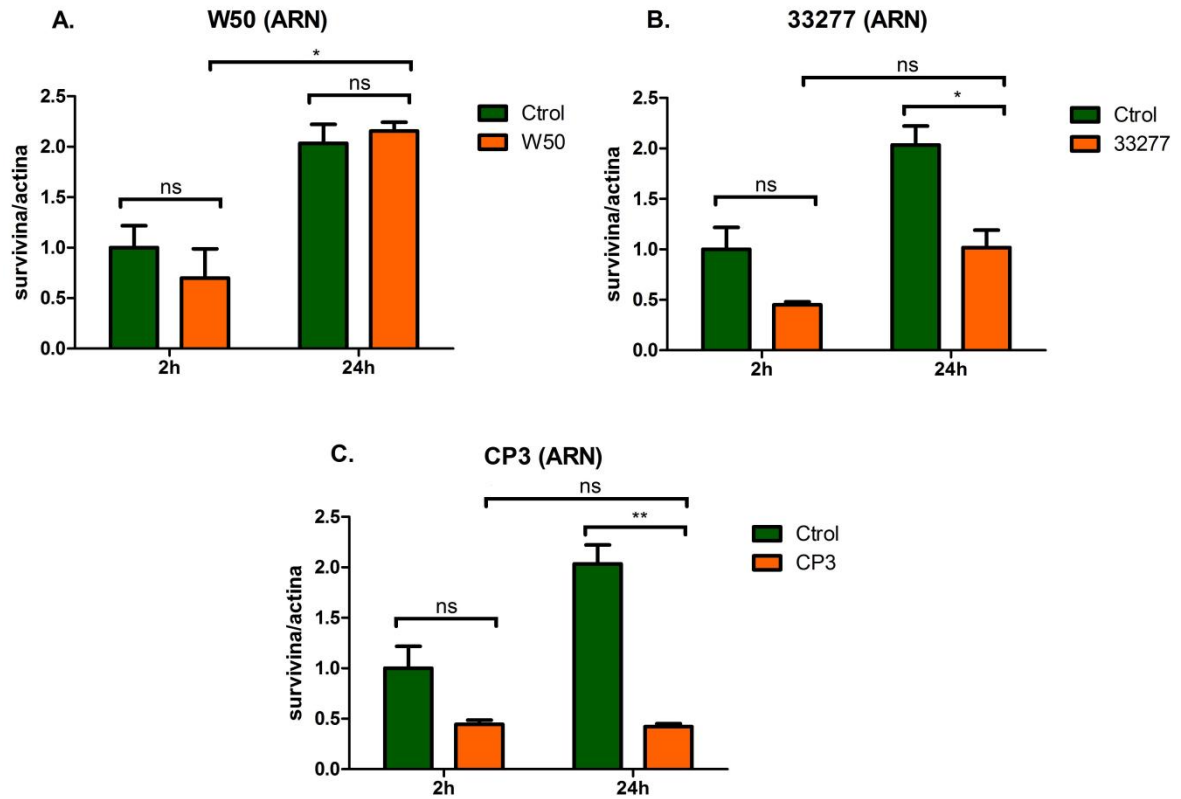


Figura 9. Comparación del efecto de cepas de *P. gingivalis* W50, 33277 y CP3 sobre los niveles de ARN mensajero de survivina sin normalizar en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2 h) y tardíos (24 h) post-invasión. Se muestran los niveles de mensajero sin normalizar a tiempos tempranos y tardíos tras la invasión por **A.** la cepa W50 **B.** la cepa W50 o **C.** el aislado CP3. Al control 2 h se le asignó el valor 1. ** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,01$, * indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,05$, "ns" indica valores no significativos considerando un valor $p > 0,05$. Este resultado proviene de al menos cuatro experimentos independientes. Se utilizó t-test desapareado de dos colas con corrección de Welch como test estadístico.

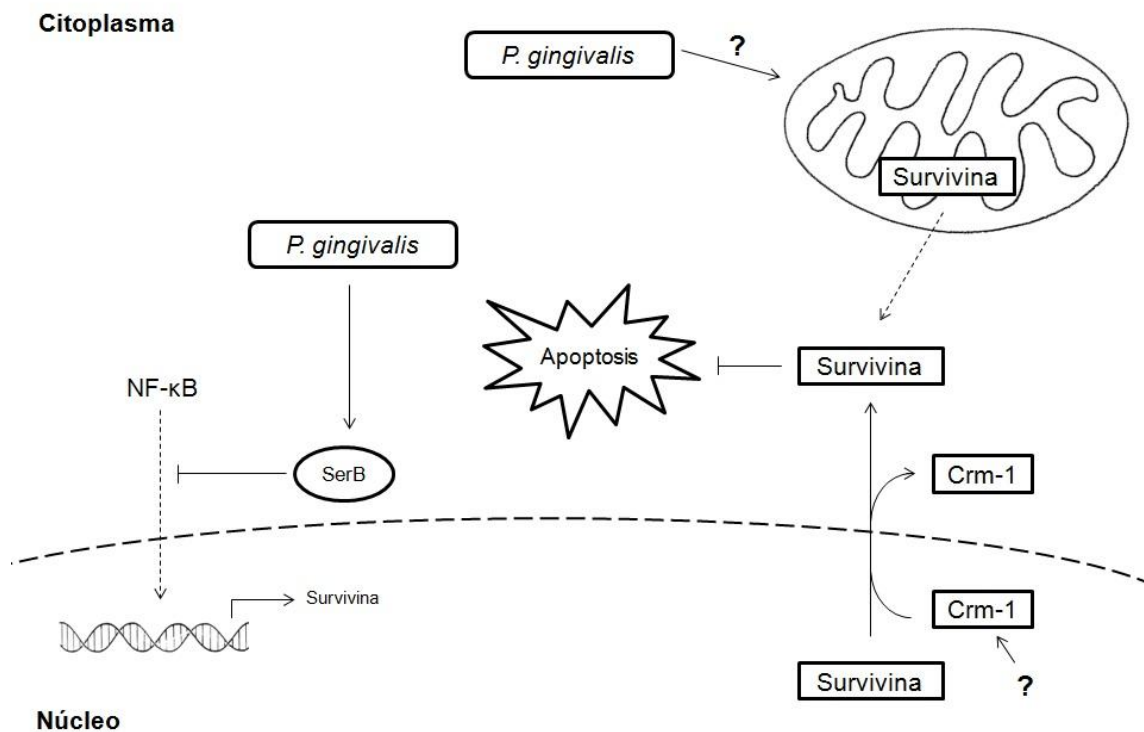


Figura 10. Posibles vías que relacionan la infección por *P. gingivalis* con la disminución de survivina en GECs. Podemos observar un esquema mostrando el interior de una célula epitelial OKF6/TERT2. Se puede observar que la liberación de una serina fosfatasa (SerB) por parte de *P. gingivalis* podría ser responsable de inhibir la translocación hacia el núcleo del factor transcripcional NF-κB y por consecuencia la transcripción de survivina. En la porción derecha de la figura se puede observar la liberación de survivina desde la mitocondria hacia el citoplasma y la translocación desde el núcleo de la proteína survivina, mediada por exportina-1 (Crm-1). Desconocemos cuál sería el estímulo que podría provocar estos dos últimos eventos.

