



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL

**Caracterización de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis*
y su efecto en la viabilidad de células epiteliales gingivales**

Isaac Maximiliano Bugueño Valdebenito

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Denisse Bravo Rodríguez

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dr. José Manuel Pérez D.
Prof. Dra. Loreto Abusleme R.

ASESORES
Prof. Dra. Anilei Hoare T.
Prof. Dr. Nicolás Dutzan M.

Financiamiento:
Proyecto Fondecyt nº 11110076 (DB), U-inicia 11/10.

**Santiago - Chile
2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ORAL**

**Caracterización de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis*
y su efecto en la viabilidad de células epiteliales gingivales**

Isaac Maximiliano Bugueño Valdebenito

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Denisse Bravo Rodríguez**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dr. José Manuel Pérez D.
Prof. Dra. Loreto Abusleme R.**

**ASESORES
Prof. Dra. Anilei Hoare T.
Prof. Dr. Nicolás Dutzan M.**

**Financiamiento:
Proyecto Fondecyt nº 11110076 (DB), U-inicia 11/10.**

**Santiago - Chile
2014**

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar debo agradecer a Dios, el cual siempre me ha ayudado y que puedo decir que todo lo que he logrado o fuese a lograr es gracias a Él.

También, a mi madre Noemí Valdebenito y a mis queridos abuelos, Audelio y Rosario, también a la vez mis padres, por todo el apoyo, esfuerzo y afecto entregado de forma abundante durante los años que me han visto crecer y estudiar, por todas las penas y alegrías pasadas, y que puedo decir que también gracias a ellos he llegado donde me encuentro ahora.

A mis amigos, compañeros, docentes y funcionarios que me apoyaron y ayudaron a lo largo de estos años de formación. En especial, agradezco a mi amiga María Fernanda Rojas, que tuvo un aporte especial y considerable durante todo mi proceso de formación como cirujano dentista y me apoyo aún en los momentos más difíciles.

No puedo dejar de agradecer también a quienes estuvieron participando activamente en la realización de este trabajo de investigación y que permanecieron siempre en el laboratorio y fueron el equipo con el que trabajé, Darna Venegas, Daniela Salinas, Christopher Soto, Ignacio Lobos y Leonor Díaz.

A la doctora Denisse Bravo Rodríguez por darme la oportunidad de realizar este trabajo y guiarme durante su elaboración. Por todo el conocimiento, ayuda y apoyo entregado, como también al Dr. Nicolás Dutzan, La Dra. Anilei Hoare, el Dr. Jorge Gamonal y la Dra. Loreto Abusleme, quienes me enseñaron muchos procedimientos que fueron necesarios para la realización de este trabajo.

También agradezco especialmente a la Profesora Leyla Gómez, quien fue mi primera tutora en el programa de colaboración-alumno de la facultad y también con quien realicé mis primeros trabajos de investigación en el laboratorio de Microbiología, y le debo gran parte del conocimiento que adquirí y por supuesto también agradecerle el afecto que me entregó.

INDICE

Resumen.....	8
1. Introducción	
1.1 La Periodontitis.....	10
1.2 Etiología de la Periodontitis.....	11
1.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i> y su papel en la periodontitis: Mecanismos de virulencia.....	14
1.4 Factores de virulencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	18
2. Hipótesis.....	22
3. Objetivos General y Específicos.....	23
4. Materiales y Métodos	
4.1 Reclutamiento de pacientes, examen clínico y obtención de los aislados clínicos.....	24
4.2 Toma de muestras clínicas de placa subgingival.....	25
4.3 Aislamiento e identificación de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	26
4.4 Cepas bacterianas de referencia y condiciones de cultivo de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
4.6 Línea de cultivo celular.....	28
4.7 Condiciones de cultivo de líneas celulares.....	28
4.8 Caracterización macromorfológica de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en medio sólido y líquido.....	29

4.9 Estudio de la presencia de cápsula en aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> mediante tinción con tinta china.....	29
4.1.0 Ensayos de formación de biopelículas de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	30
4.1.1 Determinación de la carga superficial de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> mediante ensayos de unión a citocromo C.....	30
4.1.2 Determinación de la hidrofobicidad de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> mediante ensayos adhesión microbiana a solventes.....	31
4.1.3 Extracción y caracterización del lipopolisacárido de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	32
4.1.4 Evaluación del efecto de la infección por los diferentes aislados clínicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en la viabilidad de células epiteliales gingivales.....	33
4.1.5 Análisis Estadístico.....	33
 5. Resultados	
5.1 Características clínicas de los individuos desde los cuales se obtuvieron los aislados clínicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
5.2 Características macromorfológicas de aislados clínicos y de cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> crecidas en medio sólido y líquido.....	36
5.3 Presencia de cápsula en aislados clínicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y cepas de referencia.....	42

5. 4 Capacidad de formación de biopelículas <i>in vitro</i> de aislados clínicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y cepas de referencia.....	44
5.5 Evaluación de la Carga superficial y polaridad de los aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	45
5.6. Extracción y caracterización del Lipopolisacárido de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	49
5.7. Evaluación del efecto de los diferentes aislados clínicos de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en la viabilidad de células gingivales epiteliales.....	51
6. Discusión.....	56
7. Conclusiones.....	67
8. Referencias Bibliográficas.....	69
9. Anexos	
9.1 Anexo N°1.....	86
9.2 Anexo N°2.....	87
9.3 Anexo N°3.....	88

RESUMEN:

La periodontitis es una enfermedad infecciosa multifactorial, 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. Para la iniciación de la periodontitis, se requiere la presencia de una comunidad bacteriana subgingival compleja en la cual coexisten diversos géneros y especies microbianas. Dentro de las especies del complejo rojo de Socransky que contribuyen a la etiología de la enfermedad periodontal, está *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). *P. gingivalis* es una bacteria Gram negativo que tendría especial relevancia en la progresión de la periodontitis. Entre los factores de virulencia de *P. gingivalis* se encuentran el lipopolisacárido (LPS), las fimbrias y el antígeno K o cápsula, los cuales están involucrados en el proceso de infección. La expresión de estos factores de virulencia por parte de la bacteria, puede variar de manera importante entre individuos, generando una respuesta distinta en los tejidos infectados, como en células epiteliales gingivales. Se ha descrito que *P. gingivalis* puede invadir las células epiteliales de la encía y modular diferentes vías de señalización que generen inhibición de la activación del sistema inmune e inhibición de la apoptosis celular.

En este trabajo, se evaluaron características de la envoltura celular, y propiedades macro y microscópicas de aislados clínicos de *P. gingivalis* y cepas de referencia, y se evaluó su efecto sobre la viabilidad de células epiteliales gingivales.

De esta manera, se analizaron parámetros macromorfológicos de las cepas en medios sólido y líquido. Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas, la carga superficial (mediante ensayos de unión a citocromo C y ensayos de hidrofobicidad), se estudió la presencia de cápsula (tinción con tinta china) y caracterizó los perfiles electroforéticos del LPS. Finalmente, se estudió la viabilidad y el nivel de apoptosis de células epiteliales gingivales infectadas por

dos cepas virulentas de referencia y 7 aislados clínicos de *P. gingivalis*, utilizando la línea celular OKF6/TERT2. Estos ensayos fueron realizados en tiempos tempranos, intermedios y tardíos de infección.

Nuestros resultados mostraron diferencias en el crecimiento entre aislados clínicos de individuos sanos comparados con enfermos, tanto en medio sólido como en medio líquido. En la mayoría de los aislados clínicos se observó presencia de cápsula. Además, todos formaron más biopelículas que las cepas de referencia, y no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de pacientes sanos y enfermos. Adicionalmente, la mayoría de los aislados clínicos presentó una mayor carga superficial que las cepas de referencias. Nuestros resultados también mostraron que todos los aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* fueron capaces de invadir células OKF6/TERT2. Adicionalmente, observamos que algunos aislados clínicos aumentaron significativamente la viabilidad celular a tiempos tempranos y tardíos de infección, incluso más que la cepa W50 descrita como una cepa muy virulenta y altamente invasiva.

En síntesis, nuestros resultados indican que existen diferencias macromorfológicas y de envoltura celular entre aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de individuos sanos y enfermos y que la infección por *P. gingivalis* mantiene o aumenta la viabilidad en la línea celular derivada de epitelio gingival OKF6/TERT2, como consecuencia de la modulación de la apoptosis. También, observamos que éste fenómeno es dependiente de la virulencia de la cepa. La virulencia se relaciona con características de la envoltura celular y con la presencia de ciertos componentes específicos. Estos aislados clínicos más virulentos podrían estar asociados a cuadros clínicos más agresivos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La periodontitis

La periodontitis 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 (FIGURA 1). La destrucción de estos tejidos de soporte, puede llegar incluso a la pérdida de los dientes afectados (Choi & Seymour, 2010).

La periodontitis, según la Organización Mundial de Salud, es un grave problema de salud que afecta a un 35-50% de la población adulta en todo el mundo (Petersen et al., 2005). En la actualidad, la periodontitis es un importante problema de salud en Chile. Gamonal et al. (2010) demostraron que el 93,45% de los adultos jóvenes tenían ≥ 1 sitio con pérdida de inserción clínica, presentando un nivel de inserción clínica (NIC) > 3 mm y un promedio de 6,51 dientes perdidos. En tanto, el 97,58% de los adultos mayores presentaron 15,81 dientes perdidos en promedio. Así la población adulta en Chile, muestra una alta prevalencia y extensión de pérdida de inserción clínica, siendo indicadores de riesgo de la enfermedad periodontal, la edad, sexo, nivel educativo y el hábito de tabaquismo.

La periodontitis crónica se define como una enfermedad infecciosa compleja que produce inflamación en los tejidos de soporte de los dientes, pérdida de sostén progresiva y pérdida ósea, que se caracteriza por la formación de sacos periodontales. Se reconoce como la manifestación más frecuente de la periodontitis, pudiendo afectar a un número variable de dientes con variadas tasas de progresión. Si bien su aparición puede ser a cualquier edad -pero más común en adultos- tanto la prevalencia, como la gravedad de la enfermedad aumentan con la edad (1999 International workshop for a classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999).

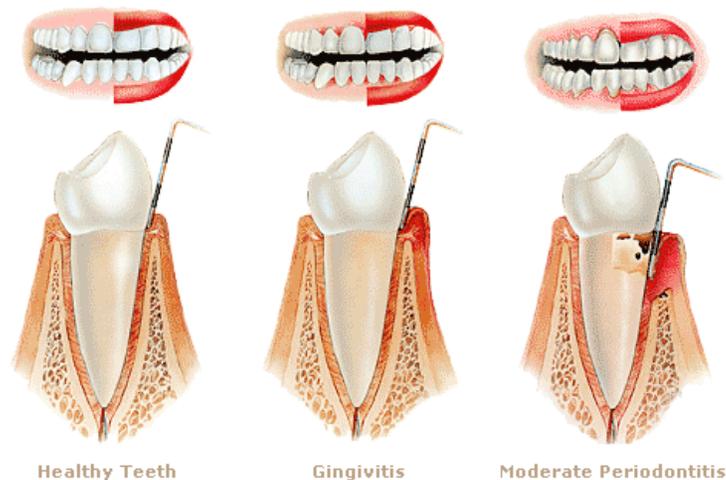


FIGURA 1.- Comparación de una encía sana con una encía que presenta signos de gingivitis y de periodontitis (<http://www.propdental.es>).

1.2 Etiología de la periodontitis

Para la iniciación de la periodontitis, es necesaria la presencia de una comunidad bacteriana subgingival compleja en la cual coexisten diversos géneros y especies microbianas. Algunos de ellos, interactuarían de forma compleja con los tejidos periodontales, adhiriéndose e invadiendo las células epiteliales para establecer la infección de éstas. En la primera interacción con las células epiteliales son fundamentales factores de virulencia bacterianos que se encuentran en la superficie de la bacteria, como el lipopolisacárido (LPS), fimbrias y antígeno K o cápsula (Singh et al., 2011). Asimismo, en el curso de la infección, estos factores desencadenarían procesos inmunológicos, como la inflamación y liberación de enzimas proteolíticas por activación de distintos mecanismos tisulares. Esta respuesta inflamatoria, que se inicia en el tejido gingival y que posteriormente se extiende a la inserción epitelial, a las fibras gingivales, al ligamento periodontal y al

hueso alveolar; provoca una pérdida progresiva de estos tejidos de soporte con una profundización del surco entre el diente y la superficie epitelial. Esto da lugar a lo que se conoce como saco periodontal, el cual, si no es tratado, hace que la pérdida del diente sea inevitable (Socransky et al., 1998, Haffajee et al., 1998, Asman et al., 1997, Slots et al., 1992, Loesche et al., 2001, Armitage 2004).

La evidencia actual indica que la periodontitis es iniciada por una disbiosis del ecosistema oral y la presencia de una microbiota sinergista, en oposición a la tradicional visión de una enfermedad infecciosa convencional en que participan sólo algunos microorganismos (Hajishengallis et al., 2012). Sobre la base de esta diversidad de organismos asociados con la periodontitis, es posible que frecuentemente existan comunidades potencialmente patógenas y que haya una variedad inmensa de microorganismos que contribuyen los factores etiológicos necesarios para que estas condiciones de disbiosis y sinergia, se puedan cumplir (Hajishengallis et al., 2012). De hecho, sólo al interior del saco periodontal se albergan desde 10^7 hasta 10^9 células bacterianas, dependiendo de su profundidad y extensión (Socransky et al., 1991, Loesche et al., 2001). Socransky et al. (1998) examinaron más de 13.000 muestras de biopelícula de placa subgingival de 185 adultos e identificaron seis grupos bacterianos específicos. En este trabajo, se analizaron las comunidades microbianas de la placa subgingival, clasificándolas según similaridad taxonómica, en seis complejos. A cada uno de estos complejos se le asignó un color distinto (FIGURA N°2): El complejo naranja compuesto por *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*; el complejo verde compuesto por *Campylobacter concisus* y *Eikenella corrodens*; el complejo amarillo compuesto por el grupo de los *Streptococcus*, *Actinomyces odontolyticus*; el complejo azul compuesto de especies de *Actinomyces*; el complejo púrpura consistente en *Actinomyces* y *Veillonella parvula*; y el complejo rojo conformado por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia* (*T. Forsythia*) y *Treponema denticola* (*T. denticola*). Este análisis no solo permitió reconocer las

comunidades, sino también ordenarlas según la secuencia de colonización, ubicación en la placa subgingival y la relación de cada comunidad con la severidad de la enfermedad periodontal. Dentro de estos complejos, los microorganismos pertenecientes al complejo naranja y rojo, son las principales especies asociadas a la colonización de la biopelícula subgingival en periodontitis.

La interacción entre los componentes microbianos y no microbianos del ecosistema oral, conduce a una forma de estabilización en que los microorganismos y formas no microbianas conviven en armonía y equilibrio con su medio ambiente. Este equilibrio sigue siendo estable a lo largo del tiempo y refleja una situación dinámica en la que las células se están muriendo y siendo reemplazadas. Esta comunidad clímax puede ser modificada de vez en cuando por fuerzas exógenas. El equilibrio tiende a ser restaurado cuando el hábitat vuelve a su estado original. En otras ocasiones, los ambientes pueden ser irreversiblemente alterados, dando lugar a un estado diferente constante y una comunidad clímax diferente en que comienza una sucesión de microorganismos y se favorece la colonización de ciertos microorganismos sobre otros.

Así es como en este nuevo modelo propuesto para la patógenesis de la periodontitis y de entre todos estos complejos microbianos, los agentes etiológicos que tienen mayor participación son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis* (FIGURA N°2).

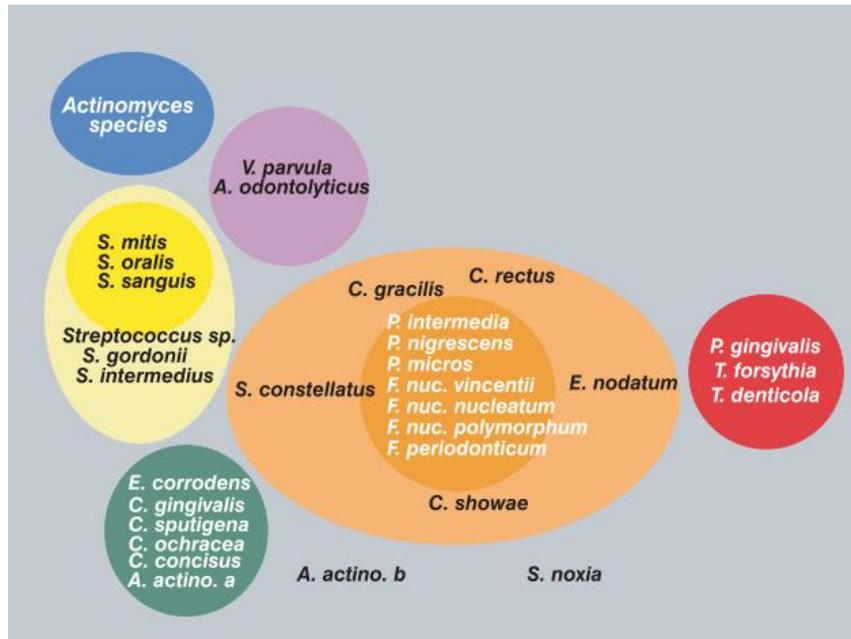


FIGURA N°2: Representación diagramática de las relaciones entre especies dentro y fuera de los complejos microbianos. Se muestran las especies bacterianas agrupadas en complejos destacados en distintos colores. Las bacterias del grupo rojo incluyen los patógenos mayormente asociados a enfermedad periodontal (Socransky et al., 2005).

Clínicamente, los complejos amarillo y verde se han asociado con sitios poco profundos (la profundidad de sondaje <3 mm), mientras que los de color naranja y rojo están relacionados con el deterioro de los parámetros clínicos, como ser una mayor pérdida de inserción y sacos periodontales más profundos. *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* se han detectado en sacos de mayor profundidad (profundidad de sondaje >4 mm) y en sitios con sangrado al sondaje. Teniendo en cuenta que la colonización de los grupos naranja y rojo ocurre en las últimas etapas de la formación de la biopelícula oral, la alteración de los colonizadores primarios (complejos verde y amarillo) podría prevenir el asentamiento de las especies más patógenas. Sin embargo, es difícil interferir con los mecanismos involucrados en la formación de la biopelícula subgingival ya que

éstos aún no se encuentran completamente dilucidados (Sbordone y Bortolaia, 2003).

1.3 *P. gingivalis* y su papel en la periodontitis: Mecanismos de virulencia

Dentro de las especies del complejo rojo, *P. gingivalis* se ha propuesto como uno de los agentes etiológicos de mayor importancia en la progresión de la periodontitis (Byrne et al., 2009; Lamont y Jenkinson, 1998; Socransky et al., 1998; Hajishengallis y Lamont, 2012).

Todas las alteraciones del equilibrio del ecosistema oral en conjunto con el proceso patológico de formación de un saco periodontal, generarán un ambiente favorable para el crecimiento de microorganismos anaerobios, como *P. gingivalis*, por sobre otras especies (López et al., 2004). Si bien el mecanismo de patogénesis exacto de la bacteria no está completamente claro, se sabe que *P. gingivalis* es capaz de invadir un rango de líneas de células epiteliales humanas *in vitro*, así como persistir y replicarse intracelularmente, lo que evitaría su detección por el sistema inmune (Inaba et al, 2006; Papapanou et al, 1994; Sandros et al, 1994; Yilmaz et al, 2002; Yilmaz et al, 2003; Yilmaz et al, 2004). Dada la importancia de esta etapa en la infección de *P. gingivalis*, muchos estudios han intentado aclarar tanto los mecanismos implicados en la internalización de la bacteria por la célula hospedera, como aquellos involucrados en la evasión del sistema inmune.

En la cavidad oral, las células epiteliales tienen la mayor superficie de contacto y son los sitios de entrada preferenciales para la invasión del hospedero por bacterias (Tribble y Lamont, 2010). Por lo tanto, la interacción que existe entre las células epiteliales gingivales (GECs) y las bacterias periodontales determinarían si el proceso de colonización sería exitoso o no. En el caso de *P. gingivalis*, las bacterias internalizadas son capaces de replicarse en el medio intracelular y propagarse a las células adyacentes (Yilmaz et al., 2006). Además, genera un ambiente intracelular favorable el cual es clave en la patogenicidad.

En estudios previos se ha observado cómo algunas células epiteliales recuperadas de la cavidad oral poseen elevados niveles intracelulares de *P. gingivalis* (Noiri et al., 1997; Vitkov et al., 2005). Esto indica que *P. gingivalis* no sólo sobrevive al interior de las GECs, sino también mantiene su viabilidad después de invadir las células (Madianos et al., 1997; Nakhjiri et al., 2001).

Las moléculas de adhesión e invasión de *P. gingivalis* le permiten adherirse e invadir células no fagocíticas, como células epiteliales de la encía, replicarse intracelularmente para persistir dentro del hospedero y de esta forma evadir la acción del sistema inmune (Inaba et al., 2006, Papapanou et al., 1994; Sandros et al., 1994; Yilmaz et al., 2002; Yilmaz et al., 2003; Yilmaz et al., 2004). No obstante, existen diferencias en la capacidad invasiva dependiendo de la variedad de factores de virulencia que posee cada cepa en particular. (Li et al., 2008). Así por ejemplo, se ha descrito que cepas que carecen del antígeno capsular K, como la cepa 33277, presentan una menor virulencia que otras que presentan esta estructura, como las cepas W50 y W83 (Bostanci y Belibasakis, 2012). De la misma forma, se ha establecido que la cepa 33277 es capaz de adherirse e internalizarse en células derivadas de cultivo primario de epitelio gingival mediante una estructura denominada fimbria mayor (Umeda et al., 2006), mientras que la cepa W50 lo hace independientemente de esta estructura, ya que no la presenta.

Ahora bien, debido a la interacción con la célula hospedera, *P. gingivalis* es capaz de activar diferentes rutas de señalización intracelular, las cuales dependerán tanto de los factores de virulencia que posea la bacteria, como de los receptores existentes en la célula hospedera (Pathirana et al., 2010).

La activación de cascadas de señalización en el hospedero gatillan una serie de eventos que le permiten a *P. gingivalis* establecer un nicho intracelular, sobrevivir y propagarse entre las células hospederas (Yilmaz et al., 2006). Dentro de este mecanismo de persistencia intracelular, se ha descrito que *P. gingivalis* es capaz de modular la sobrevivencia de la célula hospedera. En este sentido se ha

descrito que *P. gingivalis* inhibe la muerte celular por apoptosis en células de cultivo primario de epitelio gingival (Nakhjiri et al., 2001; Yilmaz et al., 2004, Yilmaz et al., 2008; Mao et al., 2007).

La apoptosis es un proceso fisiológico y altamente regulado, así su desregulación está asociada al desarrollo de graves enfermedades como cáncer y enfermedades del sistema inmune (Fadeel y Orrenius, 2005). La apoptosis se puede activar a través de dos vías principales, la vía intrínseca y extrínseca, las cuales desencadenan fenómenos celulares como activación de enzimas caspasas, el desarme de la mitocondria, la fragmentación del ADN cromosomal, la condensación de la cromatina (picnosis), y finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos que se eliminan por fagocitosis (Elmore, 2007). La activación de las vías apoptóticas ocurre a través de la acción de proteínas inductoras (pro apoptóticas) o inhibidoras (anti apoptóticas) (FIGURA N°3) (Kooijman, 2006).

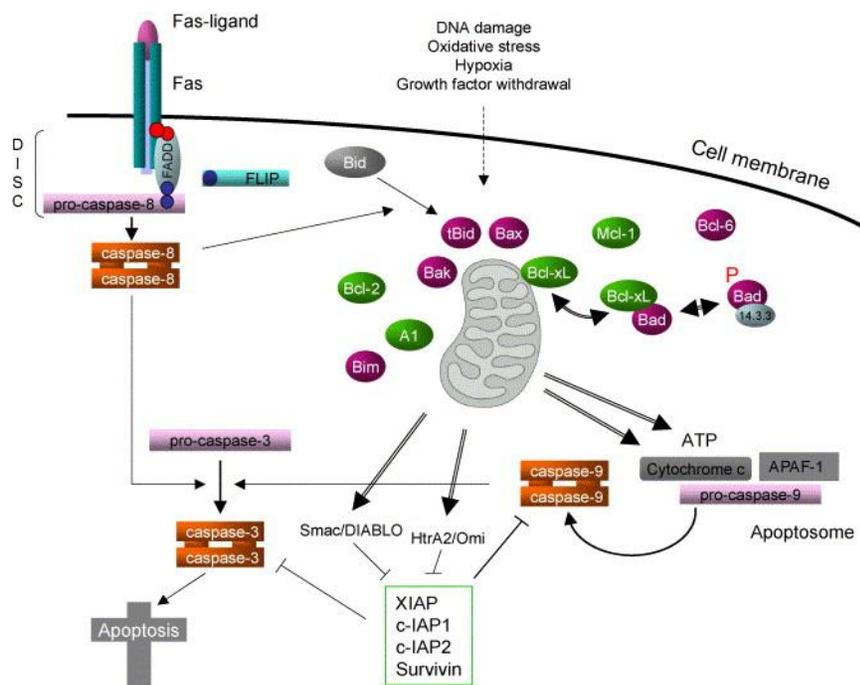


FIGURA N°3.- Esquema de la ruta de apoptosis celular. En la figura se observan las dos vías principales, la extrínseca e intrínseca de la apoptosis, y por otra parte

las proteínas involucradas ya sea en la activación o inhibición del proceso. (Kooijman, 2006).

Yilmaz et al., (2004), demostraron que tras infectar GECs con *P. gingivalis* se producía una inhibición de la apoptosis, la cual es dependiente de la activación de la proteína Akt. Por otro lado, Nakhjiri et al., (2001), avalaron esta idea al reportar en su trabajo un efecto inhibitor de apoptosis en células derivadas de cultivo primario de epitelio gingival infectadas con *P. gingivalis*. Los resultados de este trabajo indican que el aumento en la fragmentación de ADN ocurre a las primeras horas de infección. Por el contrario, sólo a tiempos tardíos de infección fue posible observar un aumento en Bcl-2 (anti-apoptótica) y una disminución de Bax (pro-apoptótica), proteínas que participan en la vía intrínseca de la apoptosis celular.

Varios autores han relacionado este aumento en la viabilidad celular con la inhibición de mecanismos apoptóticos inducidos por *P. gingivalis*. Uno de estos trabajos demostró que la infección por *P. gingivalis* moduló un total de 55 genes relacionados con la apoptosis en queratinocitos gingivales humanos inmortalizados (HIGK), aumentando la supervivencia y proliferación de estas células (Handfiel et al., 2005). Así, *P. gingivalis* sería capaz de inhibir la apoptosis en otros tipos celulares, incluyendo algunas células inmunes (Murray y Wilton, 2003; Yang et al, 2002); queratinocitos (Jarnbring et al., 2002); fibroblastos (Urnowey et al., 2006) y cultivos primarios de células epiteliales gingivales (Mao et al., 2007).

1.4 Factores de virulencia de *P. gingivalis*

Hasta la fecha, los factores de virulencia que participan en la inhibición de la apoptosis en GECs no han sido dilucidados. Pese a esto, se ha reportado que el lipopolisacárido (LPS) de *P. gingivalis* reduce la apoptosis en algunas células inmunes (Jain y Darveau, 2010), por lo que parece razonable sugerir que esta

molécula podría participar en la inhibición de la apoptosis en GECs, mediada por esta bacteria.

El lipopolisacárido es el componente principal de la cara externa de la membrana externa de bacterias Gram negativo. Es un glicolípido complejo compuesto de tres dominios unidos covalentemente: un lípido A, que está unido a la membrana externa y es responsable de la actividad endotóxica de la bacteria; el núcleo o core central que es un oligosacárido, compuesto por heptosas y hexosas, y el polisacárido O ó antígeno O (AgO), que es la parte más externa y variable de esta molécula (Raetz y Whitfield, 2002). El AgO se polimeriza en un largo preferencial de cadena y es característico de cada especie.

Se ha reportado que el LPS disminuiría la respuesta apoptótica en polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) (Hiroi et al, 1997) y monocitos (Zaric et al., 2010), mediante su interacción con receptores Tipo Toll (Murray y Wilton, 2003). Estos resultados indicarían que el LPS de *P. gingivalis* está implicado en contribuir a la supervivencia de la célula hospedero. Hasta la fecha, se ha observado que la bacteria se adhiere e invade las células hospederas, mediante la remodelación del citoesqueleto, y la reprogramación de diversas vías de transducción de señales relacionadas con la supervivencia, tales como la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Gruenheid y Finlay, 2003, Schlumberger y Hardt, 2006; Inaba et al, 2009).

Por otro lado, dentro de los principales factores de virulencia, también se ha estudiado fuertemente, el antígeno K o cápsula de *P. gingivalis*, la cual se compone principalmente de glucosa, glucosamina, galactosa, 2-acetamido-2-deoxy-D glucosa, galactosamina y los ácidos galactosaminurónico, manurónico, glucorónico y galacturónico (Laine et al, 1996). Sobre la base de su inmunogenicidad se han descrito 6 serotipos capsulares (K) diferentes, denominados K1, K2, K3, K4, K5 y K6 y se ha demostrado que cepas capsuladas de *P. gingivalis*, poseen una mayor virulencia que cepas no capsuladas (Laine et al, 1997).

En estudios más recientes, se ha observado que al estimular células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos periféricos, con los distintos serotipos K de *P. gingivalis*, los serotipos K1 y K2 inducen una mayor expresión de IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α , en comparación a los otros serotipos, demostrando que existe una variable de inmunogenicidad (Vernal et al., 2009). Así, hasta la fecha, se sabe que cepas no capsuladas de *P. gingivalis*, son más eficientes en invadir fibroblastos humanos gingivales (GFs), en comparación a cepas capsuladas, y que una vez internalizada la bacteria puede sobrevivir al tratamiento de antimicrobianos (Irshad et al, 2012). Por lo tanto, es importante considerar la presencia de cápsula al momento de estudiar la capacidad de adherencia, infección e invasión de *P. gingivalis*.

Por otro lado, el proceso de adhesión bacteriana es sumamente complejo y está afectado por diversos factores, entre ellos: características del microorganismo, naturaleza química y física de la superficie a la cual se adhiere, características del ambiente en el que crecen las células (propiedades fisicoquímicas del medio, la presencia de carbohidratos, proteínas o sustancias bactericidas, etc.). Por lo tanto, es de sumo interés, estudiar detalladamente cómo influirían factores como la hidrofobicidad de la superficie bacteriana en la respuesta generada por la célula hospedera frente a la infección, debido a que ésta es dependiente de la polaridad o carga superficial que la bacteria presente, a lo cual, la evidencia acerca de los mecanismos fundamentales que rigen el proceso de adhesión bacteriana han demostrado que tanto las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals como la interacciones ácido-base de Lewis, que impactan sobre la hidrofobicidad, están involucradas en el proceso de adhesión bacteriana (Allesen-Holm et al., 2006, Doyle et al., 2004). Asimismo, se ha demostrado que la polaridad superficial de la membrana de la bacteria, estaría implicada en procesos de autoagregación, por ende formación de biopelículas, adhesión y colonización de superficies (Davey et al., 2006, Chavant et al., 2002).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, en este trabajo se obtuvieron aislados clínicos de *P. gingivalis*, se realizó una caracterización macromorfológica de las colonias obtenidas y se caracterizaron algunas propiedades de su envoltura celular asociados a sus mecanismos de virulencia. Luego se evaluó el efecto sobre la viabilidad de GECs infectadas con estos aislados y cepas de referencia.

Los resultados de este trabajo proporcionan nuevos conocimientos relacionados con los mecanismos utilizados por *P. gingivalis* para inducir la sobrevida de GECs, aportando nuevos antecedentes sobre los mecanismos de virulencia de *P. gingivalis* en etapas tempranas de la infección.

2. HIPÓTESIS.

Cepas de *Porphyromonas gingivalis* con diferencias en propiedades de su envoltura celular, afectan diferencialmente la viabilidad de células epiteliales gingivales.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la envoltura celular de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* y cepas de referencia y evaluar su efecto sobre la viabilidad de células epiteliales gingivales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Caracterizar características macro y micromorfológicas de cepas de referencia y de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* provenientes de individuos con periodontitis crónica y periodontalmente sanos.
- 2) Caracterizar factores de virulencia de la superficie bacteriana y propiedades de su envoltura celular de los aislados clínicos provenientes de individuos con periodontitis crónica y periodontalmente sanos, y de cepas de referencia de *Porphyromonas gingivalis*.
- 3) Estudiar la viabilidad de células epiteliales gingivales infectadas por aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* que presenten diferencias en su envoltura celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reclutamiento de pacientes, examen clínico y obtención de los aislados clínicos.

Para este estudio, se utilizaron aislados clínicos obtenidos (n=7) desde individuos reclutados en la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, de acuerdo al siguiente protocolo:

Los pacientes reclutados debieron firmar un Consentimiento Informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo N°2 y N°3) y debían cumplir con los criterios de inclusión y exclusión mostrados en la Tabla N°1.

Se realizó la evaluación de pacientes y diagnóstico, utilizando las siguientes mediciones: profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínica (NIC), medidas dicotómicas de acumulación de placa y sangrado al sondaje. Se examinaron 6 sitios por diente: mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual. Todas estas medidas fueron obtenidas por un examinador calibrado (Dr. Nicolás Dutzan).

Los pacientes seleccionados tenían un diagnóstico clínico de periodontitis crónica moderada a severa de acuerdo a los criterios internacionales establecidos y la clasificación de las enfermedades periodontales (Armitage, 1999, Anexo N°1). En un período de dos semanas y luego de haber llevado a cabo el protocolo, a todos los individuos con periodontitis se les realizó el tratamiento periodontal correspondiente. Previo a realizar la toma de muestras y con el fin de facilitar las mediciones clínicas que permitieron caracterizar el grado de enfermedad, a todos los individuos se les realizó profilaxis supragingival.

Los pacientes con periodontitis Crónica Severa, tenían como mínimo 4 sacos periodontales de al menos 5 mm de profundidad y una pérdida del nivel de

inserción clínica ≥ 3 mm. De los pacientes con periodontitis, se seleccionaron los pacientes que cumplían los criterios de inclusión listados en la Tabla N°1.

TABLA N°1

<u>Criterios de Inclusión</u>	<u>Criterios de Exclusión</u>
<p>INDIVIDUOS SANOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ser > 18 años. - Sitios con profundidad al sondaje de ≤ 5 mm 	<ul style="list-style-type: none"> - Haber recibido algún tipo de terapia periodontal. - Fumar (10 o más paquetes al año). - Presentar enfermedades sistémicas que afecten la progresión de la periodontitis. - Condiciones médicas que requieran premedicación con antibióticos. - Administración de medicamentos tales como antibióticos, anti-inflamatorios esteroidales y no esteroidales 6 meses previos al comienzo del estudio. - Si es mujer, no debe estar embarazada.
<p>PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ser >35 años. - Presentar al menos 14 dientes naturales. - Al examen clínico presentar sangrado al sondaje en más de un 18% de los sitios. - Al menos 4 sitios con profundidad al sondaje de 5 mm y pérdida del nivel de inserción clínica ≥ 3 mm. 	

4.2 Toma de muestras clínicas de placa subgingival

De los individuos seleccionados, tras eliminar la placa bacteriana supragingival con una cureta estéril de la numeración correspondiente a los sitios elegidos en cada sitio periodontalmente afectado (4 sitios por paciente), se introdujeron dos conos de papel estéril nº30 Maillefer® por 20 segundos hasta su máxima longitud posible de forma paralela al eje mayor de la pieza dentaria, asimilando la inserción de una sonda periodontal. Luego, se retiraron los conos de papel y se introdujeron inmediatamente en viales que contenían 1,5 mL de Medio Reducido de Transporte (RTF: un 1lt de solución contiene: 0,45g de K₂PO₄, 0,45g de KH₂PO₄, 0,90g NaCl, 0,90g de (NH₄)SO₄, 0,18g de MgSO₄, 0,38g de EDTA, 0,40g de Na₂CO₃ y 0,20g de Ditiotreititol, teniendo la solución un pH final de 7,0) (Syed et al., 1972; Herrera et al., 1998) a 4 °C, para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, según describió Silva et al. (2008), donde se sembraron en agar sangre hemina – menadiona y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 14 días. Finalmente, se realizó la identificación de *P. gingivalis*.

4.3 Identificación de los aislados de *P. gingivalis*

A partir de las muestras de placa subgingival sembradas e incubadas a 37°C, se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000 C, Zeiss), para identificar las colonias pigmentadas de negro. Se escogieron 8 colonias bacterianas pigmentadas de negro por placa, en lo posible eligiendo cada colonia con diferente morfología. Inmediatamente se resembraron cada una por separado en agar sangre hemina – menadiona y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 7 a 10 días.

Luego, las colonias pigmentadas de negro fueron sometidas a prueba de Fluorescencia, bajo la luz ultravioleta y la adición de metanol (360 nm), la cual

resulta negativo para *P. gingivalis* (Slots et al., 1986). A los aislados identificados fenotípicamente como *P. gingivalis*, se les extrajo el DNA utilizando un kit comercial (FAVOGEN ARNr 16S), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la cantidad de DNA extraído mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (Spectrophotometer UV – 1601, Shimadzu) (Park et al. 2004). Luego se siguió la metodología de Ashimoto (Slots et al., 1995). De esta manera las bibliotecas de amplificaciones se prepararon utilizando primers que flanquean una región altamente conservada del gen 16S rRNA, para amplificar un fragmento de 404 pares de bases (partidor 1: 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3' y el partidor 2: 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3').

4.4 Cepas bacterianas de referencia y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia de *P. gingivalis* (ATCC 33227 y W50) se encontraban disponibles en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. En la TABLA N°2 se entregan las principales características de estas cepas (Bostanci y Belibasakis, 2012).

TABLA N°2. Características generales de cepas de referencia utilizadas.

Cepa	Propiedad relevante	Origen
33277	- No presenta cápsula o antígeno K - Presenta fimbria mayor (<i>fimA</i>)	Donado por el Dr. Joe Aduse Opoku, Centro de Inmunología y enfermedades infecciosas, Instituto Blizard, UK
W50	-Presencia de cápsula o antígeno K -Ausencia de fimbria mayor (<i>fimA</i>)	Donado por el Dr. Joe Aduse Opoku, Centro de Inmunología y enfermedades infecciosas, Instituto Blizard, UK

El cultivo de *P. gingivalis* se realizó según lo descrito por Silva et al. (2008). Brevemente, las bacterias se sembraron en medios no selectivos de agar sangre hemina - menadiona (5% sangre desfibrinada de caballo, 0,5 mg / L de hemina, y 0,5 mg / L menadiona); las placas se incubaron anaeróticamente a 37°C durante 7-14 días en una jarra que contiene sobres generadores de gas para la producción de una atmósfera anaerobia (Oxoid®).

También se inocularon medios líquidos no selectivos BHI (brain heart infusión) y Wilkins, suplementados con hemina - menadiona con cada uno de los aislados clínicos y las cepas de referencia para los diferentes ensayos. Los caldos se incubaron anaeróticamente a 37° C durante 1 a 3 días.

4.6 Línea de cultivo celular

Se utilizó la línea de células epiteliales OKF6-TERT2 derivada de epitelio de la mucosa oral (Dickson et al., 2000) cedida por la Dra. Anna Dongari-Bagtzoglou, School of Dental Medicine, University of Connecticut Health Center, USA.

4.7 Condiciones de cultivo Celular

Las células OKF6-TERT2 se cultivaron en medio de crecimiento para queratinocitos (Keratinocyte-Serum free médium, KSFM, Gibco) suplementado con pituitaria de bovino, factor de crecimiento epidermal (Gibco), cloruro de calcio 0,3M (Merck) y penicilina/estreptomicina, y fueron mantenidas a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ (Kimura et al., 2011). Cuando las células llegaron al 70-80% de confluencia, se lavó la monocapa celular con PBS (Gibco) y las células se removieron tratando con 1 mL de solución tripsina-EDTA (Hyclone) durante 3 min. a 37°C y posterior agitación mecánica. Alternativamente, se utilizó un “rastrillo” para soltar las células, cuando fue necesario. Luego, se agregó 5 mL de PBS para inactivar la tripsina por dilución y se resuspendieron con pipeta suavemente. Las

células resuspendidas se centrifugaron a 900 rpm durante 10 min (Hettich Zentrifugen) y el pellet celular obtenido se resuspendió en 1mL del mismo medio de crecimiento para queratinocitos. Finalmente, se contaron células utilizando una cámara de Neubauer a partir de una mezcla 1:1 de células y azul de tripán a una concentración del 10%.

4.8 Caracterización macromorfológica de los aislados clínicos y de referencia en medio sólido y líquido

Los aislados de *P. gingivalis* se sembraron y aislaron en medios no selectivos de agar sangre hemina – menadiona. Las placas se incubaron anaeróbicamente a 37° C durante 7-14 días. Una vez transcurrido el período de incubación, se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000 C, Zeiss), realizando una caracterización de acuerdo a la forma, color, tamaño, elevación, convexidad, superficie, consistencia, opacidad y textura de colonias aisladas. Se realizó un registro fotográfico de cada placa.

Además, se inocularon medios líquidos no selectivos BHI (brain heart infusión, Oxoid), suplementados con hemina - menadiona con cada uno de los aislados clínicos y las cepas de referencia. Los caldos se incubaron anaeróbicamente a 37° C durante 2-3 días. Una vez transcurrido el período de incubación, se efectuó un análisis macroscópico, realizando una caracterización de acuerdo al tipo de crecimiento en el caldo, coloración, decantación, grado de suspensión, formación de velo en la superficie y densidad óptica. También, se realizó un registro fotográfico de cada caldo.

4.9 Presencia de cápsula en aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* mediante tinción con tinta china

Las bacterias, se sembraron y aislaron en medios no selectivos de agar sangre hemina - menadiona. Las placas se incubaron anaeróbicamente a 37° C durante 7-14 días. Una vez transcurrido el período de incubación, se realizó una dilución de 5 colonias en 1ml de medio líquido BHI, luego se diluyó una vez más la muestra 5 veces y se dispensaron 5ul de la suspensión sobre un portaobjeto. Sobre la suspensión bacteriana, se agregaron 10 µl de tinta china y se esparció uniformemente la muestra sobre el portaobjeto. Se dejó secar y se cubrió completamente el frotis con Fucsina 0,1% por 2 minutos, se eliminó el exceso y se dejó secar al aire libre. Luego se observaron al microscopio óptico con un aumento de 100x con aceite de inmersión y se realizó un registro fotográfico.

4.1.0 Ensayos de formación de biopelículas de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis*

A partir de un cultivo en placa (7-14 días), se inocularon medios líquidos no selectivos BHI suplementados con hemina - menadiona con cada uno de los aislados clínicos y las cepas de referencia y se incubaron anaeróbicamente a 37° C durante 2-3 días. Luego se realizó una dilución 1:10 en el mismo medio líquido utilizado, ajustando la Absorbancia de cada una de las muestras medida a una densidad óptica de 600nm. Posteriormente, se inocularon 100 µl de la dilución a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron anaeróbicamente a 37° C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo, se lavó la biopelícula dos veces por inmersión en agua destilada y se dejó secar la placa al aire por 1h. Luego, se realizó una tinción de la biopelícula con 100 µL de safranina 0,1% por 15 min, se eliminó el exceso de colorante, lavando dos veces por inmersión en agua destilada.. Finalmente, se eluyó el colorante retenido en la biopelícula con 100 µL

de etanol 95% por 5 min, se traspasaron 100 μ L de la disolución de etanol a una nueva placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en lector de Microplacas para Absorbancia ELx800.

4.1.1 Determinación de la carga superficial de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* mediante ensayos de unión a Citocromo C

Se creció un cultivo hasta fase estacionaria en medio líquido no selectivo BHI, suplementado con hemina - menadiona (con cada uno de los aislados clínicos y las cepas de referencia, incubándolo a 37° C durante 2-3 días en anaerobiosis. Se centrifugó cada uno de los caldos en tubos cónicos, a 9000rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* dos veces con 1 ml de una solución de PB (buffer fosfato) 10mM pH 6,8. Luego, se resuspendieron los *pellets* en 1 ml de PB y se les midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm. Se tomó el volumen (Volumen_x) necesario para que en 1 ml de cultivo se obtenga una DO_{600} de 5, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{DO}_{600\text{medida}} * \text{Volumen}_x = 5 * 1000\mu\text{l}$$

$$\text{Volumen}_x = 5000 / \text{DO}_{600\text{medida}}$$

Posteriormente, se llevaron los volúmenes tomados a 1,2 ml final de la suspensión bacteriana en tubos eppendorf y se le agregaron 30 μ L de citocromo C (10mg/ml en PB), a cada una de las muestras, dejándolas incubar por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron por 2 min a 13.000 rpm, se recuperaron los sobrenadantes (1ml) y se les midió la densidad óptica a una longitud de onda de 530nm.

4.1.2 Determinación de la hidrofobicidad de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* mediante ensayos adhesión microbiana a Solventes

Los ensayos de adherencia microbiana a solventes (Microbial adhesion to solvents (MATS)) se basan en la comparación de la afinidad de células microbianas a un solvente polar y a uno no polar. Se utilizaron los siguientes solventes: cloroformo, un solvente aceptor de electrones, y hexadecano, un solvente no polar (Bellon-Fontaine et al., 1996).

Para ello una suspensión microbiana de aproximadamente 10^8 UFC ($DO_{600}=0,6$ en caldo BHI suplementado con Hemina-Menadiona) en 2,4 ml de $1,5 \times 10^{-1}$ M de NaCl se agitó en vórtex durante 60s con 0,4 ml de uno de los solventes. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar durante 15 minutos para asegurar que las dos fases se encuentren completamente separadas. Luego se tomó una muestra (1 ml) desde la fase acuosa muy cuidadosamente y se midió la densidad óptica a 400 nm. El porcentaje de células presentes en cada solvente se calculó posteriormente mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Afinidad} = 100 \times [1 - (A/A_0)]$$

Donde A_0 es la densidad óptica a 400 nm de la suspensión bacteriana antes de la mezcla y A es el absorbancia medida luego de realizar la mezcla.

Cada experimento se realizó por triplicado mediante el uso de tres caldos BHI suplementados con hemina-menadiona sembrados desde varias colonias de una misma cepa crecida previamente en placa de agar sangre.

4.1.3 Extracción y caracterización del LPS de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis*

Se caracterizaron los perfiles electroforéticos de LPS de los aislados clínicos de *P. gingivalis* y de las cepas de referencia (ATCC 33227 y W50). Para ello, se ajustaron cultivos líquidos a una DO_{600} de 2,0 en un volumen final de 1,5 ml de caldo BHI. Las células se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en 150 ml de buffer de lisis (SDS 2% (p/v) y β -mercaptoetanol 4% (p/v) en 0,5 M de buffer Tris-HCl, pH 6,8). Luego, las células se hirvieron y se incubaron con proteinasa K, seguido por la extracción con fenol a 70°C y una posterior extracción de la fase acuosa con éter. El LPS se separó en geles de acrilamida 14% (p/v), utilizando un sistema buffer de Tricina SDS (Marolda et al., 2006). Los geles se tiñeron con plata mediante una modificación del procedimiento de Tsai y Frasch, 1982. Luego se realizó un análisis de densitometría usando el software de geles UN-SCANT-IT (Silk Scientific).

4.1.4 Evaluación del efecto de la infección por los diferentes aislados clínicos de *P.gingivalis* en la viabilidad de células epiteliales gingivales

Las GECs OFK-6 TERT2 fueron infectadas por *P. gingivalis* a diferentes tiempos y la viabilidad se estudió mediante el método de MTS, utilizando el Kit CellTiter 96 ®" de Promega. Para ello se creció *P. gingivalis* en placas de agar sangre, luego se inocularon a partir de ellas caldos BHI suplementados con hemina-menadiona, posteriormente se les midió la densidad óptica, para realizar la infección celular con una multiplicidad de infección (MOI) igual a 100. El día previo al ensayo de MTS, se dispusieron las células gingivales epiteliales en una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos (FALCON), con una concentración de 25.000 células por pocillo. Luego se realizó la invasión de las células por *P. gingivalis*, durante 90 minutos y posteriormente, se agregó una mezcla de antibióticos, Metronidazol + Gentamicina (200 μ g/ml y 300 μ g/ml respectivamente),

para eliminar todas las bacterias extracelulares. Luego, se mantuvieron las células invadidas por 2,12 horas y 24 horas post-infección. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las monocapas se lavaron y se les agregó 20 μ l de la mezcla de reactivos MTS, para finalmente, medir la absorbancia a 490nm en lector de Microplacas para Absorbancia ELx800.

4.1.5 Análisis Estadístico

Para determinar la significancia estadística de los resultados de los ensayos se aplicó el test “one way ANOVA” y se compararon los datos entre aislados clínicos, cepas de referencia y controles respectivos, dependiendo de los diversos ensayos realizados, mediante el post-test “Tukey” y el post-test “Dunnett”. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0.1.

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas de los individuos desde los cuales se obtuvieron los aislados clínicos de *P. gingivalis*.

Las características clínicas de los pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos incluidos en el estudio se indican en la TABLA N°3. Se tomaron tres aislados de pacientes sanos (H1, H2 Y H3) y cuatro aislados de pacientes con periodontitis crónica (CP1, CP2, CP3 Y CP4). Entre ambos grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad o género. Sí se pudieron observar porcentajes significativamente más altos de sitios con sangrado al sondaje y un mayor nivel de pérdida de inserción clínica en el grupo con periodontitis crónica ($p < 0,05$).

TABLA N°3. Características clínicas de los pacientes con periodontitis crónica y pacientes periodontalmente sanos.

GRUPO	Pacientes con Periodontitis Crónica (4)	Pacientes sanos Periodontalmente
Edad (PROM \pm DE)	40,75 \pm 12,23	33,33 \pm 11, 37
% de mujeres	75	66
Profundidad al sondaje (mm, PROM \pm DE)	2,94 \pm 0,94	2,69 \pm 0,26
NIC (mm, PROM \pm DE)	4,27 \pm 0,76 *	1,70 \pm 0,35
% de sitios con placa bacteriana	67,4 \pm 28,6	58,24 \pm 22,6
% de sitios con sangrado al sondaje	51,5 \pm 22,2 **	18,4 \pm 6,54

* Promedio de NIC de pacientes con periodontitis versus pacientes sanos.

** Porcentaje de sitios con sangrado al sondaje en pacientes con periodontitis versus porcentaje de sitios en pacientes sanos

5.2 Características macromorfológicas de aislados clínicos y de cepas de referencia de *P. gingivalis* crecidas en medio sólido y líquido.

Ciertas características de la morfología de las colonias en medio sólido pueden asociarse con la presencia de componentes de la superficie bacteriana, tales como hidratos de carbono que forman parte de importantes factores de virulencia como cápsula, lipopolisacárido, entre otros. Así, la presencia o ausencia de estas moléculas de superficie, podrían estar asociados con diferentes mecanismos de virulencia de la bacterias (Drenkard et al, 2002; Götz et al, 2004; Haussler et al, 2003). En este trabajo, se estudió la forma, el tamaño, la textura, el color, la superficie, el brillo, la elevación y la convexidad en medios sólidos de los aislados clínicos de *P. gingivalis* y las cepas de referencia. Todas las colonias crecidas a partir del cultivo de los aislados provenientes de individuos sanos (H1, H2 y H3) fueron predominantemente rugosas, pigmentadas de negro, con elevación, convexas, de forma circular y difícil de disgregar. Por el contrario, las colonias de los aislados de pacientes con periodontitis crónica (CP1, CP2, CP3 Y CP4) fueron de borde liso, de color marrón oscuro, poca elevación y fáciles de disgregar; similar a las colonias de las dos cepas de referencia 33277 y W50 (FIGURA N°4). En medio líquido, los aislados de pacientes sanos mostraron una fuerte agregación, mostrando acúmulo de grumos en el fondo del tubo, en comparación con muestras de pacientes con periodontitis crónica o las cepas de referencia (FIGURA N°5). En la TABLA N°4 se detallan las características macromorfológicas de cada una de las cepas obtenidas al crecerlas en medio sólido, como líquido.

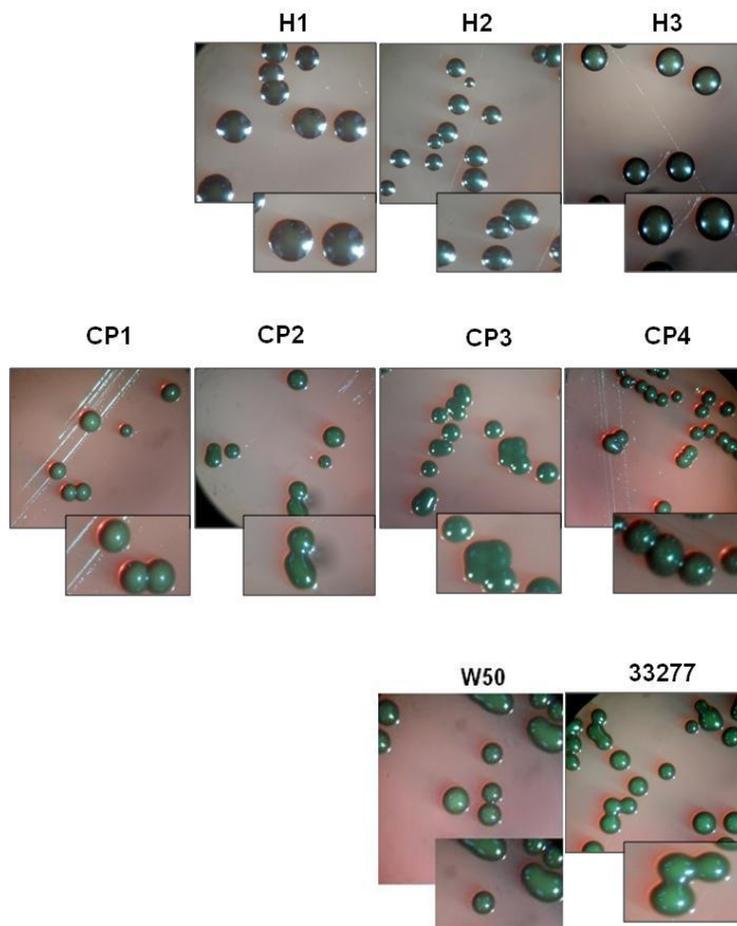


FIGURA N° 4.- Fotografías bajo lupa estereoscópica de las colonias en medio sólido, de los aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis* utilizadas en este estudio.

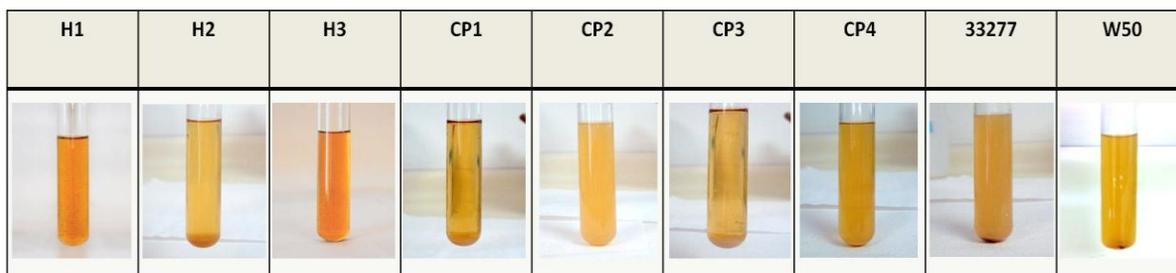


FIGURA N° 5.- Fotografías del crecimiento de *P. gingivalis* en medio líquido. H1, H2, H3, CP1, CP2, CP3 y CP4 corresponden a aislados clínicos y 33277, W50 a cepas de referencia utilizadas en este estudio.

TABLA N°4. Características macromorfológicas evaluadas del crecimiento y desarrollo de colonias en medio sólido y líquido de cada aislado clínico y cepa de referencia. Los cultivos fueron analizados como se describió en materiales y métodos (punto 4.4).

Cepa	Caracterización en medio sólido	Caracterización en medio líquido
H1	Forma: Circular Textura: rugosa Color: Negro Consistencia: Firme, no se disuelve fácilmente Opacidad: Brillante Elevación: ++ Convexidad: ++ Tamaño: ++	Tipo de Crecimiento: Sedimentado Suspensión: + Agregación: +++ Formación de grumos: +++ Coloración: Negro Formación de velo: - Crecimiento (DO _{600nm}): 0,2-0,5
H2	Forma: Circular Textura: rugosa Color: Negro Consistencia: Firme, no se disuelve fácilmente Opacidad: Brillante Elevación: +++ Convexidad: +++ Tamaño: ++	Tipo de Crecimiento: Sedimentado y suspendido Suspensión: ++ Agregación: + Formación de grumos: + Coloración: Blanquecino Formación de velo: + Crecimiento (DO _{600nm}): 0,4-1,0
H3	Forma: Circular Textura: Rugosa Color: Negro Consistencia: Firme, no se disuelve fácilmente Opacidad: Brillante Elevación: ++ Convexidad: ++ Tamaño: +++	Tipo de Crecimiento: sedimentado Suspensión: + Agregación: +++ Formación de grumos: +++ Coloración: Negro Formación de velo: - Crecimiento (DO _{600nm}): 0,3-0,8

CP1	<p>Forma: Circulares y otras irregulares Textura: lisa Color: café oscuro Consistencia: no resistente, se disuelve fácilmente Opacidad: Brillante Elevación: + Convexidad: + Tamaño: ++</p>	<p>Tipo de Crecimiento: sedimentado y suspendido Suspensión: ++ Agregación: + Formación de grumos: - Coloración: blanquecino Formación de velo: + Crecimiento (DO₆₀₀nm): 1,0-1,6</p>
CP2	<p>Forma: Circulares Textura: lisa Color: café oscuro Consistencia: no resistente, se disuelve fácilmente Opacidad: Brillante Elevación: ++ Convexidad: +++ Tamaño: +</p>	<p>Tipo de Crecimiento: sedimentado y suspendido Suspensión: ++ Agregación: + Formación de grumos: - Coloración: café Formación de velo: + Crecimiento (DO₆₀₀nm): 0,8-1,6</p>
CP4	<p>Forma: Circulares y otras irregulares Textura: Lisa Color: café oscuro Consistencia: no resistentes, se disuelven con facilidad Opacidad: Brillante Elevación: ++ Convexidad:++ Tamaño: +</p>	<p>Tipo de Crecimiento: sedimentado y suspendido Suspensión: ++ Agregación: + Formación de grumos: - Coloración: blanquecino Formación de velo: - Crecimiento (DO₆₀₀nm): 0,6-1,0</p>
CP4	<p>Forma: Circulares y otras irregulares Textura: Lisa Color: café oscuro Consistencia: no resistentes, se disuelven con facilidad Opacidad: Brillante Elevación: ++ Convexidad:++ Tamaño: +</p>	<p>Tipo de Crecimiento: sedimentado y suspendido Suspensión: ++ Agregación: + Formación de grumos: - Coloración: blanquecino Formación de velo: - Crecimiento (DO₆₀₀nm): 0,6-1,0</p>

33277	Forma: Circulares y otras irregulares Textura: Lisa Color: café oscuro Consistencia: no resistentes, se disuelven con facilidad Opacidad: Brillante Elevación: + Convexidad: + Tamaño: ++	Tipo de Crecimiento: sedimentado y suspendido Suspensión: +++ Agregación: ++ Formación de grumos: - Coloración: café Formación de velo: - Crecimiento (DO ₆₀₀ nm): 1,5-2,0
W50	Forma: Circulares y otras irregulares Textura: Lisa Color: café oscuro Consistencia: no resistentes, se disuelven con facilidad Opacidad: Brillante Elevación: + Convexidad: + Tamaño: +	Tipo de Crecimiento: sedimentado y suspendido Suspensión: +++ Agregación: + Formación de grumos: - Coloración: blanquecino Formación de velo: - Crecimiento (DO ₆₀₀ nm): 0,7-1,5

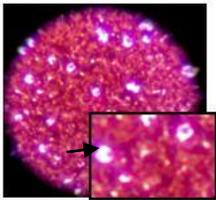
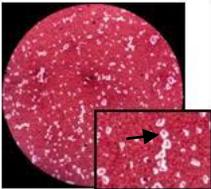
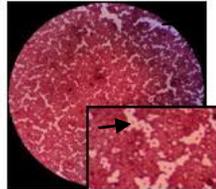
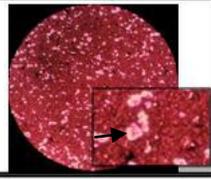
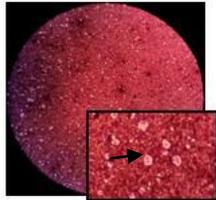
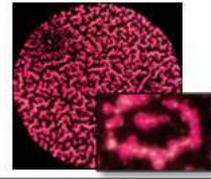
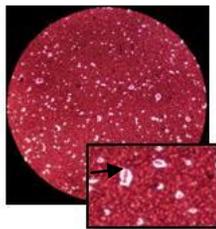
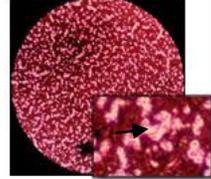
Leyenda	<ul style="list-style-type: none"> • Forma: Circulares/irregulares/otras formas específicas • Textura: Lisa, Rugosa, mixta • Color: Café claro/café oscuro / blanquecino / negro. • Consistencia: No resistentes/firmes-/facilidad de disolver • Opacidad: Brillante/opaca • Elevación: muy elevada (+++), medianamente elevada(++), poco elevada(+), sin elevación(-) • Convexidad: Completamente convexa(+++), convexa en el centro(++), leve convexidad(+), cóncava(-) • Tamaño: Colonias de gran tamaño(+++), medianas(++), pequeñas(+) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo de Crecimiento: sedimentado o suspendido o ambos • Suspensión: gran turbidez(+++), mediana turbidez(++), poca turbidez(+), sin turbidez(-) • Agregación: gran cantidad de agregado en el fondo del tubo(+++), mediana cantidad(++), poca cantidad(+), nula(-) • Formación de grumos: forma muchos grumos(+++), medianamente(++), pocos grumos(+), no forma(-) • Coloración: Negro/café oscuro/claro/blanquecino • Formación de velo: forma velo(+), no forma(-) • Crecimiento: Densidad óptica a las 48 hrs a 600nm
----------------	---	---

5.3 Presencia de cápsula en aislados clínicos de *P. gingivalis* y cepas de referencia.

Como fue descrito anteriormente, W50 es una cepa capsulada y por lo tanto más virulenta que la cepa 33277, que no posee cápsula (Bostanci y Belibasakis, 2012). En este trabajo se estudió la presencia de cápsula en todos los aislados clínicos utilizando la técnica de tinción con tinta china.

En general, tanto los aislados de pacientes con periodontitis crónica como los de individuos sanos, mostraron presencia de cápsula. La única excepción fue el aislado clínico H1 que no presentó cápsula (TABLA N°5). Como control de la técnica se realizó tinción de cápsula también en las cepas W50 y 33277; los resultados demostraron que solamente la primera es capsulada, tal como se había reportado previamente (Bostanci y Belibasakis, 2012).

TABLA N° 5. Examen microscópico para evaluar la producción de cápsula de los aislados clínicos y de las cepas de referencia. Se muestran imágenes tomadas con un aumento total de 100x al microscopio óptico de las células bacterianas de cada uno de los aislados clínicos y cepas de referencia. La zona clara alrededor de las células indica la presencia de la cápsula.

Cepa/Aislado clínico	Presencia de capsula	Fotografía al microscopio óptico 100x	Cepa/Aislado clínico	Presencia de capsula	Fotografía al microscopio óptico 100x
H1	-		CP1	+	
H2	+		CP2	+	
H3	+		CP3	+	
ATCC 33277	-		CP4	+	
W50	+				

5. 4 Capacidad de formación de Biopelículas *in vitro* de aislados clínicos de *P. gingivalis* y cepas de referencia

Un elemento clave para la supervivencia bacteriana es la capacidad de crear un nicho ecológico protegido donde las bacterias se pueden propagar con éxito. Así es como las bacterias que habitan en la cavidad oral son capaces de persistir en ella, mediante la adhesión a una variedad de superficies, tales como la película salival adquirida en la superficie de los dientes, las células gingivales epiteliales, o las interacciones con otras bacterias. Sin una adhesión adecuada, las bacterias son arrastradas y eliminadas, siendo incapaces de formar este nicho. Es por esto que la adherencia y el desarrollo de biopelículas son fundamentales para la persistencia en la cavidad oral.

En el contexto de nuestro estudio, evaluamos la capacidad de los aislados clínicos de formar biopelículas *in vitro*, para relacionar estos resultados con características de la envoltura celular.

De esta manera, se observó que todos los aislados clínicos de *P. gingivalis* formaron más biopelícula que las cepas de referencia. En general, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de individuos sanos y enfermos, a excepción de uno de los aislados de pacientes con periodontitis crónica (CP3), que presentó una mayor capacidad de formar biopelículas en comparación con todas las otras cepas y aislados clínicos (FIGURA N°6).

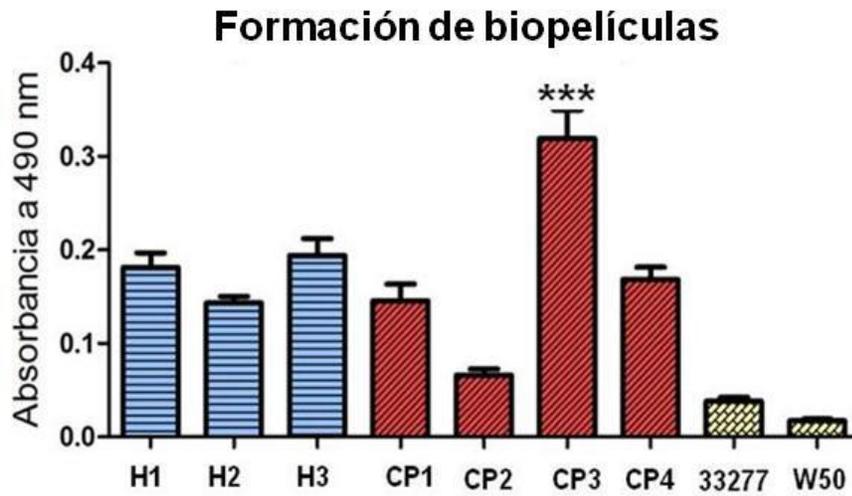


FIGURA N° 6.- Cuantificación de la formación de biopelículas por cada uno de los aislados clínicos y cepas de referencia W50 y 33277 de *P. gingivalis*. La absorbancia medida a una DO_{490} nm es proporcional a la cantidad de biopelícula formada. Las barras representan las desviaciones estándar de 5 experimentos realizados de manera independiente en triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el test “one way ANOVA” y post-test “Dunnett”. *** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,001$.

5.5 Evaluación de la Carga superficial y polaridad de los aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis*.

Ha sido reportado que mutantes incapaces de sintetizar polímeros capsulares, presentan una menor hidrofobicidad superficial y en consecuencia un aumento en autoagregación de las células de *P. gingivalis* (Davey et al., 2006). Por lo tanto, las diferencias observadas en la autoagregación de los aislados clínicos en medio líquido podrían estar relacionadas con diferencias en la carga superficial. Más aún, es posible especular que los aislados que presentaron una

mayor agregación, deberían tener una menor carga superficial y una mayor hidrofobicidad. Para evaluar estas propiedades, se utilizaron dos aproximaciones experimentales: ensayos de unión a citocromo C y ensayo de afinidad por N-hexadecano y cloroformo.

Citocromo C es una proteína con actividad enzimática, cuyo sitio activo contiene un centro de hierro. Cuando esta proteína se encuentra en reposo, el grupo hierro se encuentra oxidado (Fe^{3+}) y cuando se une a un sustrato, se inicia un transporte de electrones donde éstos son donados a ese sustrato (reacción de óxido-reducción). Por lo tanto, cuando una bacteria posee una carga negativa superficial alta, tendrá una mayor afinidad por esta proteína, debido a que tiene una mayor capacidad para donar electrones.

La mayoría de los aislados clínicos, excepto CP3, mostraron una baja unión a citocromo C en comparación con la cepa de referencia 33277 y en menor grado con la cepa W50. El aislado CP3 presentó la menor carga negativa neta superficial, en comparación a todos los otros aislados y también a las cepas de referencia (TABLA N° 6).

TABLA N°6. Evaluación de carga superficial bacteriana. Los valores representan los porcentajes de unión a Citocromo C luego de su incubación con la bacteria por 10 minutos a temperatura ambiente. Los valores corresponden a los promedios y las desviaciones estándar de los 5 experimentos independientes realizados en triplicado.

Aislado clínico / Cepa	Porcentaje de Unión a Cit C
H1	62,2 ± 6 *
H2	67,7 ± 9 *
H3	70,1 ± 2*
CP1	75,9 ± 3*
CP2	69,0 ± 4*
CP3	11,27 ± 8
CP4	58,4 ± 10*
33277	12,4 ± 9
W50	31,7 ± 8*

*Representa el porcentaje de unión a citocromo C con significancia estadística considerando un valor de $p < 0,05$ en comparación a la cepa de referencia 33277. Se aplicó el test "one way ANOVA y el post-test de "Dunnett".

Ya que se ha demostrado que los mecanismos asociados a la adhesión bacteriana dependen, en parte, de la hidrofobicidad superficial de la bacteria, la siguiente aproximación experimental en este punto fue realizar ensayos de adherencia a solventes (Microbial adhesion to solvents (MATS)). Estos ensayos se basan en la comparación de la afinidad de células microbianas a un solvente polar y a un solvente no polar. La mayor afinidad de una bacteria por el cloroformo, un solvente ácido, se debe a que las bacterias bajo estudio presentarían propiedades básicas o dadoras de electrones. El carácter dador de electrones puede atribuirse a la presencia de grupos básicos en la superficie celular, como por ejemplo, grupos carboxílatos (COO^-), fosfatos (PO_4^{-3}) y grupos aminos (NH_2). Por el

contrario, una mayor afinidad por N-hexadecano implicaría que la bacteria presenta una mayor hidrofobicidad en los componentes de su envoltura (Bellon-Fontaine et al., 1996).

Antecedentes previos reportaron que la cepa ATCC 33277, es altamente afín a N-hexadecano y por lo tanto más hidrofóbica que W50 (Rosenberg et al., 1991). Nuestros resultados indican que casi todos los aislados clínicos de *P. gingivalis*, a excepción de CP3, CP4, así como W50 son altamente afines al cloroformo. CP3 y CP4 presentaron una afinidad por N-hexadecano significativamente mayor que los otros aislados y más similar a la de ATCC 33277. En cuanto al aislado CP1, este presentó una afinidad similar por cloroformo y por N-hexadecano, lo cual podría indicar que presenta una superficie con una polaridad intermedia. Por otra parte, en los ensayos de unión a citocromo C, presentaba alta afinidad a esta proteína, y debido a que su afinidad por cloroformo fue levemente mayor, sugerimos que tendría una tendencia a presentar una menor hidrofobicidad y una mayor carga negativa superficial (TABLA N°7).

TABLA N° 7. Evaluación de la polaridad superficial de los aislados clínicos y cepas de referencias, de acuerdo a su respectiva afinidad a los solventes Cloroformo y N-Hexadecano. Se realizaron 3 ensayos MATS independientes por triplicado con los 2 solventes de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los valores indican los porcentajes de afinidad a cada solvente y sus desviaciones estándar de los 3 experimentos realizados de manera independiente y al realizar el análisis estadístico.

	Pacientes sanos			Pacientes con Periodontitis				Cepas de referencia	
	H1	H2	H3	CP1	CP2	CP3	CP4	33277	W50
Hexadecano	22 +/- 2 *	47 +/- 5 *	41 +/- 8 *	59 +/- 6 *	36 +/- 2 *	94 +/- 7	74 +/- 3	65 +/- 8	33 +/- 8 *
Cloroformo	90 +/- 5 *	89 +/- 3 *	72 +/- 4 *	53 +/- 5	84 +/- 1 *	42 +/- 4	46 +/- 3	52 +/- 2	76 +/- 8 *

*Representa el porcentaje de unión a N-Hexadecano y a Cloroformo respectivamente, con significancia estadística en comparación a la cepa de referencia 33277. Se aplicó el test "one way ANOVA y el post-test de "Dunnett".

5.6. Extracción y caracterización del LPS de aislados clínicos y cepas de referencia de *P. gingivalis*.

Como se comentó anteriormente, la morfología de las colonias se asociaría con la presencia de ciertos componentes de la superficie bacteriana, tales como hidratos de carbono, los que a su vez podrían estar relacionados con la resistencia a compuestos antimicrobianos (Drenkard et al, 2002; Götz et al, 2004; Haussler et al, 2003), Además, cambios en la autoagregación bacteriana y la morfología de las colonias han sido relacionados con ciertas modificaciones en el LPS (Yamaguchi

et al, 2010). Por lo tanto se aisló LPS a partir de cada uno de los aislados clínicos y de las cepas de referencia, y se caracterizaron sus perfiles electroforéticos en geles SDS-PAGE-tricina.

Los aislados de pacientes con periodontitis CP1, CP2 y CP4 presentaron un LPS completo, donde se puede observar la presencia del lípido A-core y moléculas de antígeno O distribuidas de manera uniforme de bajo y alto peso molecular, similar al perfil de ambas cepas de referencia (33277 y W50). CP3, en tanto, presentó una distribución de largos de cadena de AgO diferente a las cepas de referencia, con una distribución de largos de cadena más aleatoria. Interesantemente, los aislados provenientes de individuos sanos, no presentaron moléculas de AgO de alto peso molecular (FIGURA N° 7), más aún se observa que la región del lípido A-core tiene una menor movilidad electroforética (se ve más arriba en el gel), lo que sugiere que poseen un mayor peso molecular.

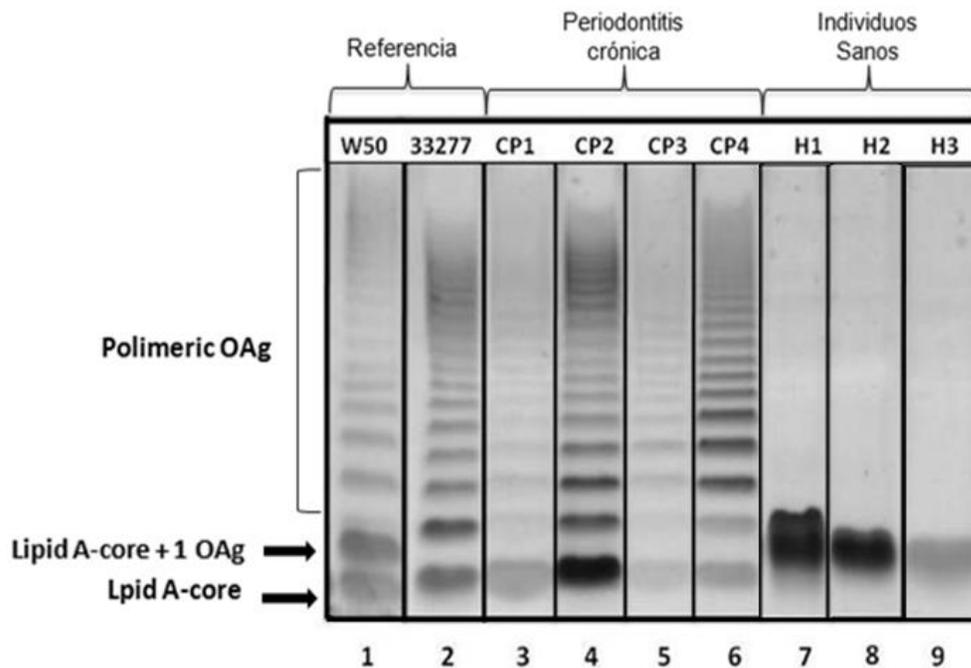


FIGURA N°7.- Perfiles de LPS de aislados clínicos de *P. gingivalis*, obtenidos de pacientes con periodontitis crónica, de individuos sanos, y de las cepas de referencia. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de Tricina-SDS-poliacrilamida seguido por la tinción con plata. La carga bacteriana fue estandarizada al inicio del protocolo de extracción. En la figura se muestran: carril 1: W50, carril 2: ATCC 33277, carril 3-6: aislados clínicos de pacientes con periodontitis crónica (CP), carriles 7-9: aislados clínicos de individuos sanos (H). Las diferentes regiones del LPS se indican a la izquierda.

5.7. Evaluación del efecto de la infección por los diferentes aislados clínicos de *P. gingivalis* en la viabilidad de células epiteliales gingivales.

Se ha descrito que *P. gingivalis* modula la apoptosis de células epiteliales gingivales infectadas (Nakhjiri et al., 2001; Yilmaz et al., 2004; Stathopoulou et al., 2009). En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio se demostró que la cepa de *P. gingivalis* W50 podía aumentar la sobrevivencia de la línea de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2, no así la cepa 33277 (González 2013). En

este trabajo se determinó el efecto de todos los aislados clínicos de *P. gingivalis* en la viabilidad de células OKF6/TERT2, mediante ensayos de MTS.

Este ensayo permite determinar la viabilidad celular mediante la determinación espectrofotométrica de un compuesto coloreado derivado del metabolismo mitocondrial (formazan). Este valor de absorbancia es directamente proporcional a la actividad mitocondrial, lo que se correlaciona con la viabilidad celular (Scudiero et al., 1988).

Se realizaron ensayos de MTS en células OKF6/TERT2 a tiempos tempranos (2h), tiempos intermedios (12h) y tiempos tardíos (24h) post-invasión, de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Como se observa en la Figura N°8, ni las cepas de referencia, ni los aislados clínicos de sanos y enfermos, afectaron la viabilidad de las GECs luego de las 2 horas de incubación, post 90 minutos de invasión, en comparación con las células sin infectar (control)

Ensayo MTS 2 horas post invasión

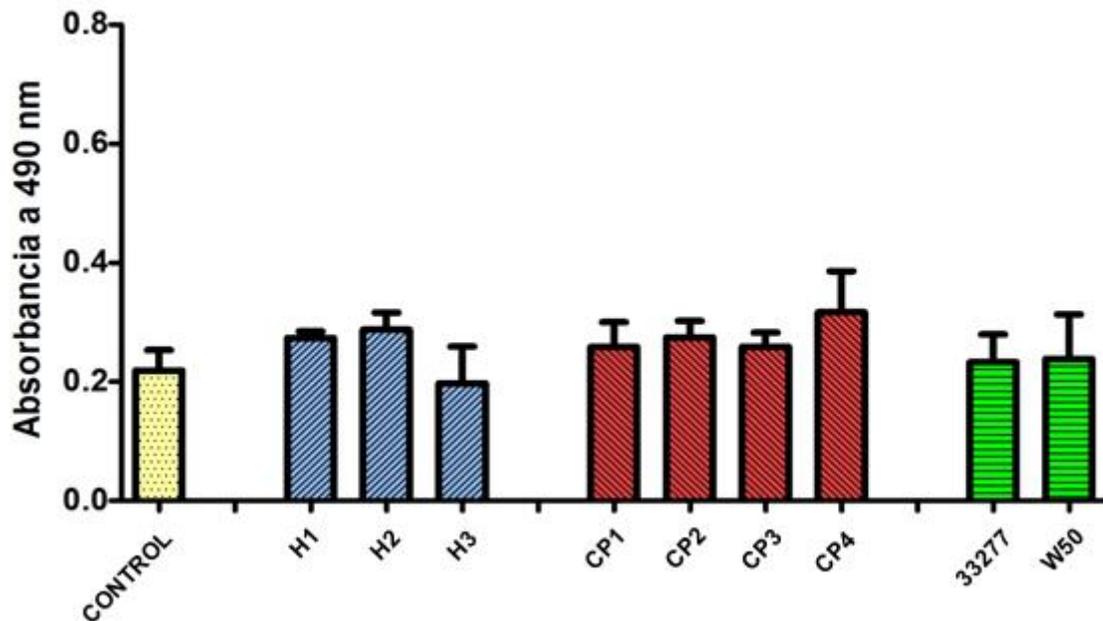


FIGURA N°8.- Efecto de aislados clínicos de *P. gingivalis* sobre la viabilidad de células OKF6/TERT2 a tiempos tempranos de infección. Absorbancia de células OKF6/TERT2 medida a las 2h post invasión con los aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de pacientes sanos (H1, H2, H3) y con periodontitis crónica (CP1, CP2, CP3, CP4) y cepas de referencias (W50 y 33277). Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes realizados en triplicado, donde * indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,05$.

Posteriormente, se determinó la viabilidad de células OKF6/TERT2 a tiempos intermedios de infección (12 h, post 90 min de invasión) con las diferentes cepas y aislados de *P. gingivalis*. A este tiempo, se observó un leve aumento de la viabilidad de células infectadas con los aislados H1, CP2, CP3 Y CP4 (FIGURA N°9).

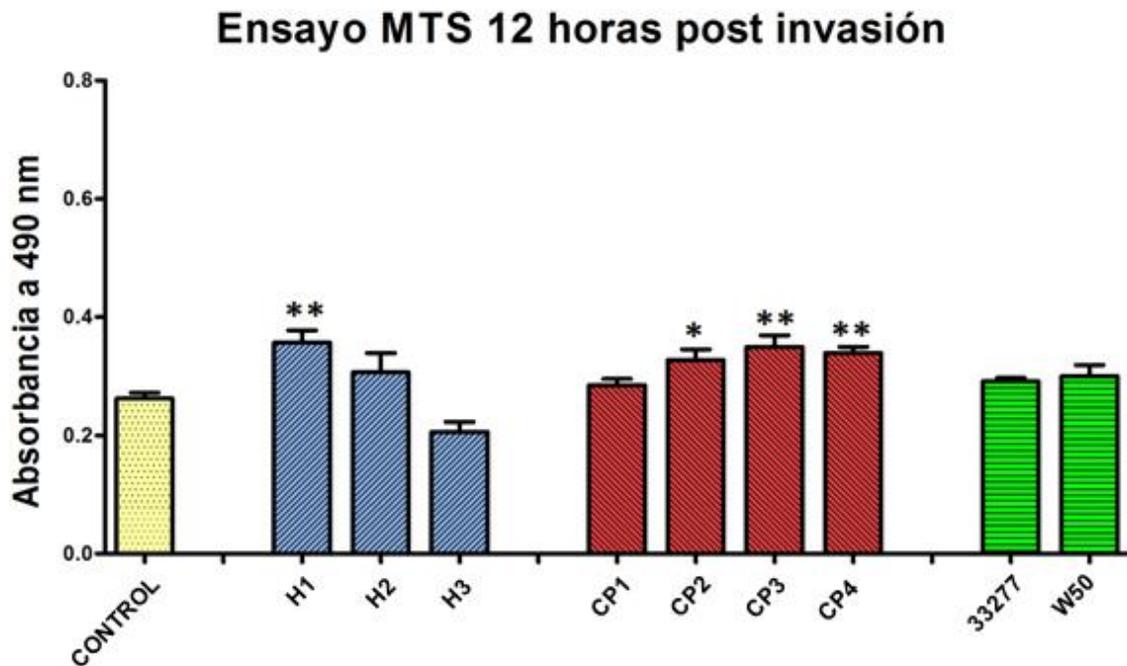


FIGURA N°9.- Efecto de *P. gingivalis* sobre la viabilidad de células OKF6/TERT2 a tiempos intermedios de infección. Absorbancia de células OKF6/TERT a las 12h post invasión con los aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de pacientes sanos (H1, H2, H3) y con periodontitis crónica (CP1, CP2, CP3, CP4) y cepas de referencias (W50 y 33277). Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes realizados en triplicado, donde * indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,05$ y ** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,01$ y *** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,001$.

Finalmente, se determinó la viabilidad de células OKF6/TERT2 a tiempos tardíos de infección (24 h, post 90 min de invasión). En esta condición observamos un aumento significativo de la absorbancia en los pocillos de células infectadas con *P. gingivalis* provenientes de los aislados clínicos de un paciente sano (H2), de tres aislados de pacientes con periodontitis crónica (CP2, CP3 Y CP4) y de la cepa de referencia W50. Cabe destacar que el aumento observado en las cepas

CP3 y CP4 es casi tres veces mayor que el control y casi dos veces superior que la cepa de referencia W50. Por su parte, las células infectadas con la cepa 33277 y los aislados clínicos H1 Y CP1 no presentaron diferencias significativas en la absorbancia. Las células infectadas con el aislado clínico H3 presentaron una disminución estadísticamente significativa en la absorbancia, lo que sugiere una disminución en la viabilidad de las células (FIGURA N°10).

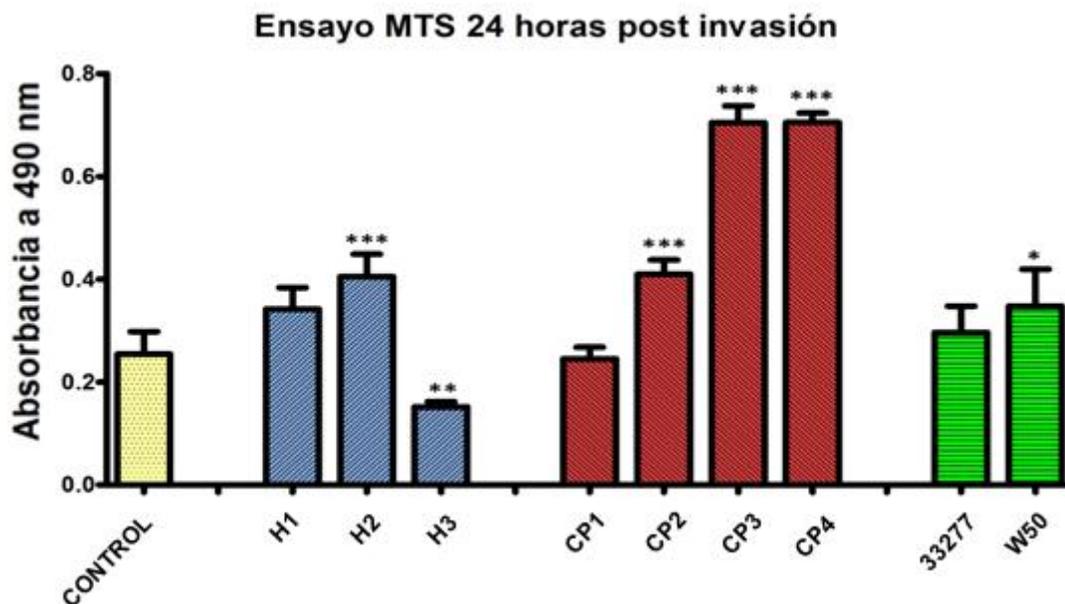


FIGURA N°10.- Efecto de *P. gingivalis* sobre la viabilidad de células OKF6/TERT2 a tiempos tardíos de infección. Absorbancia de células OKF6/TERT a las 24h post invasión con los aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de pacientes sanos (H1, H2, H3) y con periodontitis crónica (CP1, CP2, CP3, CP4) y cepas de referencias (W50 y 33277). Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes realizados en triplicado, donde * indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,05$ y ** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,01$ y *** indica diferencias significativas considerando un valor de $p < 0,001$.

6. DISCUSIÓN

P. gingivalis es un microorganismo asociado a la progresión de la enfermedad periodontal y si bien se ha avanzado en la dilucidación de las comunidades microbianas más frecuentemente involucradas en la transición de salud a enfermedad que indican que existe un delicado balance ecológico entre sus miembros (Abusleme et al., 2013), existe aún mucho por dilucidar respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la interacción que estos microorganismos establecen con las células hospederas. En este sentido, conocer sobre los mecanismos de virulencia de *P. gingivalis* y cómo este microorganismo interactúa con la célula hospedera durante el curso de la patología, es de gran relevancia.

En primer lugar es importante remarcar que una de las limitaciones de este estudio fue el número de individuos incluidos (4 pacientes con periodontitis crónica y 3 pacientes sanos periodontalmente). Uno de los motivos fue la dificultad para aislar la bacteria desde muestras de placa subgingival de paciente sanos, lo cual podría explicarse por la baja prevalencia de *P. gingivalis* en este tipo de individuos (Aas et al., 2005).

A pesar de este bajo número de muestras, una ventaja importante de nuestro estudio es que se evaluaron una serie de características fenotípicas de estos aislados para relacionarlos con características de su virulencia. Así, se pudo realizar una comparación de estos aislados clínicos con cepas de referencia, y además correlacionar las características estudiadas con los signos clínicos que presentaba cada paciente.

En cuanto a la caracterización macromorfológica de cada uno de los aislados, pudimos observar que existen diferencias en el crecimiento en medio sólido, la macromorfología y la autoagregación de las colonias de aislados de

pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos (FIGURAS N° 4 y 5). Esto podría deberse a que los aislados de ambos grupos poseen diferencias a nivel genético o que expresan diferentes proteínas de acuerdo al ambiente en el que se encuentran. Es así como en un trabajo recientemente publicado se ha demostrado que a partir de muestras de placa subgingival provenientes de pacientes con enfermedad periodontal, presentan una mayor cantidad de genes y expresión de proteínas involucradas en la síntesis de toxinas celulares como genes para LPS o colagenasa PrtC y que existe una fuerte asociación entre la estructura de las comunidades bacterianas subgingivales y el estado periodontal de un individuo (Wang et al., 2013).

En otros trabajos publicados previamente, se demostró que existe una correlación entre la virulencia de *P. gingivalis* y variaciones en el color, la morfología y la hidrofobicidad de las colonias (Takeda et al., 2008; McKee et al., 1988). De la misma forma, la composición de la cápsula, los defectos en la biosíntesis de LPS, reducción de la actividad de las proteasas gingipainas, aumento de la autoagregación, y el aumento de la formación de biopelículas han sido implicados en estas diferencias en el crecimiento colonial (Yamaguchi et al., 2010). En el trabajo de Yamaguchi (2010), los autores demuestran que la pigmentación colonial en placas de agar sangre se relaciona con la hemaglutinación y la actividad de Arg-gingipaina (RGP) y Lys-gingipaina (Kgp), además de otros factores de virulencia. Esto se explicaría por la presencia de complejos gingipaina-adhesina en la superficie de la célula bacteriana que modifican la pigmentación de las colonias, así como alteraciones en la superficie de la bacteria se correlacionan con cambios en la capacidad de autoagregación, y con la formación de biopelículas.

Además, como se indicó anteriormente, la hidrofobicidad de las células bacterianas afecta su afinidad con otras bacterias y así su capacidad de autoagregación (Narimatsu et al., 2004). Sin embargo, Yamaguchi et al. (2010), demostraron que una cepa mutante de *P. gingivalis*, en un gen putativo de la

glicosiltransferasa, el cual tiene un dominio común para esta enzima en su extremo N-terminal, y que fue denominado *gtfA*, presentaba una disminución considerable en la autoagregación cuando era deficiente para este gen, en comparación a la cepa silvestre, presentando también una mayor hidrofobicidad en su membrana y su capacidad de adherirse a células epiteliales se veía severamente afectada, por lo tanto sus resultados sugirieron que este gen sería necesario para la autoagregación de *P. gingivalis* y jugaría un rol importante en la patogenicidad de esta bacteria por la regulación de la adhesión. Pero por otro lado, se sugiere que la habilidad de autoagregar de *P. gingivalis*, no puede ser explicada solamente por la hidrofobicidad de la membrana superficial.

En nuestro estudio, los aislados clínicos provenientes de pacientes con periodontitis crónica CP3 Y CP4, presentaron una alta hidrofobicidad y baja autoagregación, lo cual está de acuerdo con los resultados de Yamaguchi et al. (2010). Coherente con la alta hidrofobicidad observada, estos aislados clínicos también presentaron una baja unión a Citocromo C, es decir una baja carga negativa neta superficial (TABLA N°6). Interesantemente, estos aislados provenían de pacientes que presentaban signos clínicos de periodontitis crónica más severa y de mayor extensión (TABLA N°3), en comparación a los aislados CP1 y CP2. Por el contrario, los aislados provenientes de donantes sanos, presentaron en general una baja hidrofobicidad y una alta carga negativa superficial (TABLA N° 7).

En cuanto a la relevancia de la carga neta superficial durante la infección, se ha reportado que una alta carga negativa en la bacteria, estaría relacionada con una mayor susceptibilidad a péptidos catiónicos (Hancock and Sahl 2006; Wang et al. 2010), pudiendo así ser eliminados más fácilmente por el sistema inmune innato. Nuestros resultados fueron coherentes con esta idea; así, los aislados clínicos provenientes de pacientes sanos (H1, H2 Y H3), que presentaron una alta carga negativa neta superficial, presentaron una alta susceptibilidad a péptidos catiónicos (Díaz et al., 2014). Sin embargo, aún cuando algunos de los aislados clínicos provenientes de pacientes con periodontitis crónica también

presentaron una alta carga negativa neta superficial (CP1 Y CP2), fueron menos susceptibles a péptidos catiónicos, por lo que sugerimos que otros factores de virulencia deben de estar involucrados en dicha susceptibilidad.

En relación a la cápsula de *P. gingivalis*- así como en otras bacterias Gram negativo y también Gram positivo, es importante mencionar que ésta se relaciona con una mayor virulencia (Grenier et Mayrand, 1987, Van Steenberg et al., 1987). La cápsula de *P. gingivalis* se compone principalmente de glucosa, glucosamina, galactosa, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosa, galactosamina y los ácidos galactosaminurónico, manurónico, glucorónico y galacturónico y en base a su inmunogenicidad, se han descrito 6 serotipos capsulares (K) diferentes, denominados K1, K2, K3, K4, K5 y K6 (Laine et al., 1996).

Estos seis serotipos (K1-K6) de *P. gingivalis* poseen distinta virulencia tanto *in vitro* como en modelos animales. Cuando los 6 serotipos capsulares se inocularon subcutáneamente en animales de experimentación, se observó un proceso infeccioso severo tipo flegmón, asociado a úlceras y/o necrosis de piel y muerte del animal. En contraste, al inocular con una cepa de *P. gingivalis* carente de cápsula, sólo se observaron abscesos localizados, demostrándose la importancia en la virulencia de la cápsula extracelular. Por otro lado, cuando en modelos murinos, se evaluó la respuesta de los macrófagos ante los distintos serotipos K de *P. gingivalis* (Schifferle et al., 1989), las quimioquinas MIP-2, JE/MCP-1, KC y RANTES aumentaron su expresión en presencia del serotipo K1 en comparación a los otros serotipos. Lo anterior sugiere una respuesta quimiotáctica diferente inducida por los distintos serotipos K de *P. gingivalis*.

Esto podría explicarse porque la cápsula juega un rol importante en la evasión del sistema inmune del huésped, como lo es la evasión de la fagocitosis, promoviendo la sobrevivencia de la bacteria al interior celular e incrementando su virulencia (Singh et al., 2011).

Como se ha señalado anteriormente, está bien documentado que la agregación de bacterias orales juega un papel importante en el desarrollo de la placa bacteriana oral (Handley et al., 2003). Así es como en el estudio de Davey et al., (2006) se propuso que una supresión de la expresión de la cápsula provocaría un cambio en las propiedades superficiales de la cepa capsulada W83, como lo es la autoagregación o capacidad de formación de biopelículas. Anteriormente, se había propuesto que la autoagregación podía ser atribuida a las interacciones mediadas por la fimbria mayor (Kuramitsu et al., 1997). Sin embargo, en el mismo estudio antes mencionado de Davey, demostraron que la cepa W83, aún no expresando fimbria, presentaba una alta autoagregación bacteriana.

De acuerdo con estos resultados, se ha postulado que una variedad de proteínas de superficie quedan expuestas cuando los polisacáridos capsulares no están presentes. Así, a diferencia de las interacciones celulares mediadas por estructuras poliméricas tales como las fimbrias o la cápsula, que se encuentran mucho más expuestas en la superficie de la célula bacteriana, en la autoagregación mediada por proteínas de superficie no capsulares, se genera un contacto mucho más íntimo o cercano y por lo tanto una mayor autoagregación.

En nuestro trabajo, observamos que la mayoría de los aislados clínicos obtenidos tanto de individuos sanos como con periodontitis crónica, presentaron cápsula, excepto H1. Esto sugiere por una parte que la cápsula es importante en la colonización, sin embargo para la progresión de la patología se requerirían otros factores de virulencia.

La formación de una biopelícula involucra la unión específica de las células a una superficie y el crecimiento sobre ella, seguido por desprendimiento y la difusión a un nuevo sitio para iniciar el ciclo de nuevo (O'Toole et al., 2000).

Davey et al. (2006), evaluaron cómo la producción de la cápsula afectaría la formación de biopelículas por *P. gingivalis*. Sus resultados indican que la producción de cápsula bloquea la formación de biopelícula, y por tanto, sugieren

que la presencia de cápsula se relacionaría más bien con la diseminación del microorganismo y no con la adherencia y formación de biopelícula. En otro estudio reciente se demostró que una mutación en el gen *PG0106*, que comparte gran similitud con el gen *gtfA* de la glicosiltransferasa y que se encuentra involucrado en la síntesis de cápsula, inhibe la autoagregación, la unión a las células epiteliales gingivales y la maduración de fimbrias en la superficie de *P. gingivalis* (Yamaguchi et al., 2010). Así, muchas y diferentes interacciones de *P. gingivalis* con superficies, como las células epiteliales gingivales y entre otras células bacterianas, son mediadas por moléculas de superficie, como gingipaínas, fimbrias, polímeros capsulares, entre otras. Más aún, es probable que estas moléculas sean esenciales para la iniciación y el desarrollo de estas biopelículas (Davey et al., 2006).

En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas respecto a la formación de biopelículas entre pacientes sanos y con enfermedad periodontal, sin embargo es importante destacar que uno de los aislados de pacientes con periodontitis crónica (CP3) formó una gran cantidad de biopelícula. Este aislado también presentó una alta hidrofobicidad, baja autoagregación y baja carga negativa superficial. Estas características podrían correlacionarse con parámetros clínicos como una importante pérdida de inserción y la gran extensión de la enfermedad periodontal en boca con sacos periodontales de gran profundidad. El aislado CP4, también obtenido de un paciente con signos clínicos severos, igualmente presentó una alta capacidad de formación de biopelículas y una hidrofobicidad baja, pero en menor proporción que CP3, mostrado en los resultados de unión a citocromo C y su afinidad por N-hexadecano.

Es importante que si bien la cápsula es relevante en el desarrollo de las interacciones responsables de la formación de biopelículas, no es la única molécula superficial a tener en consideración. Como ya comentamos, Davey et al. (2006) demostraron que la alteración de la estructura de componentes expuestos

a la superficie bacteriana, especialmente de polisacáridos de superficie, aumentan la autoagregación y la formación de biopelículas. Interesantemente, estas estructuras no sólo se refieren a los polisacáridos capsulares, sino también al LPS y de otros factores aun no conocidos.

Asimismo, la presencia de ciertos componentes de la superficie bacteriana, tales como hidratos de carbono también afectaría la morfología de las colonias.. En particular, se han relacionado ciertas modificaciones en el LPS bacteriano con cambios en la autoagregación y la morfología de las colonias (Drenkard et al, 2002; Götz et al, 2004; Haussler et al, 2003, Takada et al, 1998, Yamaguchi et al, 2010).

En nuestro estudio, demostramos que existen diferencias en la morfología de las colonias, la capacidad de agregación en medio líquido y la producción de LPS entre los aislados clínicos provenientes de pacientes con periodontitis crónica y los de individuos sanos. Estos últimos, corresponden a colonias rugosas, lo cual puede relacionarse con la ausencia de la región del AgO del LPS. Además, presentaron una mayor capacidad de autoagregación en medio líquido y mayor sensibilidad a péptidos catiónicos según los resultados de Díaz et al. (2014, manuscrito en revisión). Además en el estudio ya mencionado de Wang et al. (2013), donde demostraron que hay cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis del LPS u otras toxinas celulares, en muestras de individuos con periodontitis, cabe mencionar que si bien estos cambios podrían deberse a alteraciones en los patrones de producción del LPS relacionados con la respuesta inmune contra la bacteria, no es posible descartar a priori, que esta molécula también esté involucrada en la interacción entre bacterias, con la célula epitelial, y más aún en la agresividad de la infección.

Finalmente, en este estudio se investigó si las diferencias fenotípicas descritas de los aislados clínicos pueden relacionarse con la viabilidad de células epiteliales gingivales. Antecedentes previos de nuestro laboratorio indican que la

cepa W50 aumenta la viabilidad de células epiteliales gingivales, a diferencia de la cepa 33277 que es menos virulenta (González, 2013). Por ello sería interesante evaluar si la presencia de cápsula afecta la viabilidad de células epiteliales gingivales o podría relacionarse incluso a un factor que no hayamos analizado.

La infección de todos los aislados clínicos y cepas de referencia utilizadas de *P. gingivalis* fueron capaz de aumentar o al menos mantener la viabilidad de células OKF6/TERT2 de forma diferencial. Como observamos, a las 2 horas no hubo variación significativa de la viabilidad de las células infectadas por los aislados clínicos, pero a las 12 horas ya existían diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los aislados de pacientes sanos y de pacientes con periodontitis crónica, respecto al control, donde se observó que los aislados H1, CP2, CP3 y CP4 comenzaron a aumentar la viabilidad de las células OKF6/TERT2 y no así con las cepas de referencia. Ahora bien, a las 24 horas, si se observó que en general los aislados de pacientes con periodontitis aumentaron la viabilidad celular de forma significativa, sobre todo CP3 Y CP4. Con estos resultados podemos sugerir que existe un aumento en la viabilidad celular, mediada por la infección por *P. gingivalis* y que a partir de las características estudiadas, es posible especular diferencias en propiedades de la envoltura celular que podrían explicar las diferencias observadas sobre la viabilidad de GECs.

Existen ciertos antecedentes en la literatura que apoyan esta hipótesis. Irshad et al. (2012), demostraron la importancia de la cápsula en el proceso de invasión de fibroblastos gingivales por *P. gingivalis*. Así, la cepa capsulada W83 invadía más efectivamente este tipo celular, que la cepa no capsulada HG91 y que una cepa W83 mutante defectuosa en la cápsula. Respecto a nuestros aislados clínicos, queda aún por evaluar sus habilidades para invadir GECs. Lo anterior es relevante, ya que no se ha demostrado si el efecto de *P. gingivalis* sobre la viabilidad de estas células es durante la invasión propiamente tal (entrada de la bacteria a la célula), o en etapas previas de adhesión u otro tipo de interacción. Si bien este proceso de colonización de las células del tejido gingival no se encuentra

completamente dilucidado, es posible especular que existe un amplio rango de interacciones posible entre la bacteria y la célula. Más aún, en estas múltiples interacciones posibles, podrían estar involucradas moléculas superficiales muy variadas –tanto bacterianas como del hospedero- que podrían dar cuenta de la respuesta final de la GEC en términos de su viabilidad.

A pesar de ello, en nuestro trabajo identificamos la presencia de cápsula en la mayoría de los aislados clínicos, lo que sugiere que la sola presencia de la cápsula no contribuye al aumento en la viabilidad de células epiteliales gingivales, pero sí podría estar involucrada en la colonización y establecimiento de la bacteria en la biopelícula subgingival. Por otra parte, Wang et al. (2013) demostraron que bacterias aisladas desde placa subgingival de pacientes con periodontitis presentan distintos patrones de expresión de genes relacionados con la producción de LPS, de la quimiotaxis bacteriana, formación flagelar y biosíntesis de toxinas. Si bien este estudio no apunta exclusivamente a *P. gingivalis*, es importante rescatar que existiría una modificación de la producción de LPS fuertemente asociada al proceso de enfermedad.

Por lo tanto frente a estos resultados, es relevante que en estudios futuros se siga apuntando a la importancia de otros factores diferentes de la cápsula, como el LPS. En relación a esto, como fue mencionado en la introducción, el LPS se ha asociado a una disminución de la respuesta apoptótica en neutrófilos (PMNN) (Hiroi et al, 1998) y monocitos (Zaric et al., 2010), mediante su interacción con receptores Tipo Toll (Murray y Wilton, 2003). Así con todos estos últimos avances, podríamos sugerir que el LPS de *P. gingivalis* contribuye a la supervivencia de la célula hospedera.

Es importante considerar que el aumento de viabilidad celular debe complementarse con ensayos que permitan discernir si este efecto debe a una menor apoptosis de las GECS o a otro mecanismo de muerte celular. Mediante la detección del marcador apoptótico Anexina V, en nuestro laboratorio, demostramos que W50 disminuye los niveles de apoptosis de las células

infectadas, lo que se correlaciona con una mayor viabilidad de la células (González, 2013). Por lo tanto, esperaríamos que los aislados clínicos que aumentaron la viabilidad de las células infectadas, también presentaran menores niveles de apoptosis.

Interesantemente, los aislados clínicos CP3 Y CP4, presentaron un considerable aumento de la viabilidad de las células OKF6/TERT2, una alta capacidad de formar biopelículas, baja carga negativa neta superficial y alta hidrofobicidad. Adicionalmente, es importante considerar que justamente estas muestras provenían de pacientes con un cuadro clínico de gran severidad y extensión. Por lo tanto, sugerimos que todas estas características en conjunto, podrían explicar la generación de signos clínicos de una periodontitis mucho más severa.

Finalmente, cabe mencionar que respecto al tratamiento convencional periodontal, donde se realiza una eliminación del tártaro supragingival como también de la placa subgingival a través del curetaje por sitios afectados por la enfermedad periodontal, es importante que estos estudios sigan llevándose a cabo y generando nuevos avances en el conocimiento de la enfermedad, debido a que si los patógenos periodontales son capaces de internalizarse en las células gingivales, evitar su fagocitosis, evadir la respuesta inmune y más aún si fuese factible que aumente la viabilidad de las células epiteliales gingivales en el paciente, entonces será necesario replantear y modificar en parte la terapia periodontal, enfocada hacia una eliminación no sólo de la placa supra y subgingival sino también del patógeno a nivel intracelular, para evitar una perduración, recidiva y progresión de la enfermedad a largo plazo.

Con los resultados en esta investigación, hemos podido avanzar en la comprensión de las diferencias observadas en un patógeno de gran importancia en la ecología oral, en los estados de salud y enfermedad. Esto además abre nuevos temas de investigación que permitirán entender las diferencias en las

sucesiones ecológicas de las comunidades microbianas que participan en el balance del ecosistema bucal.

Nuestra investigación sugiere que podría existir una asociación entre ciertas propiedades, principalmente relacionadas con características superficiales de *P. gingivalis*, y la agresividad y progresión de la periodontitis. Futuros trabajos de nuestro laboratorio estarán enfocados a dilucidar cómo estas características pueden afectar la estructura de la biopelícula subgingival y la respuesta inmune asociada, y si es posible identificar un patrón de factores de virulencia asociado a salud y enfermedad.

7. CONCLUSIONES

Existen diferencias claras en características macromorfológicas de las colonias y en su crecimiento en medio líquido de aislados clínicos provenientes de pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos.

Aislados clínicos de *P. gingivalis* tienden a formar una mayor cantidad de biopelícula que cepas de referencia, mientras que no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de formar biopelículas de los aislados provenientes de individuos con periodontitis en comparación a individuos sanos.

Ciertos aislados clínicos provenientes de pacientes con periodontitis crónica, que presentan cuadros clínicos de gran severidad y extensión tendrían una tendencia a presentar una baja carga negativa superficial y una mayor hidrofobicidad en comparación a aislados de pacientes sanos y aún de otros individuos con periodontitis.

Existen diferencias notorias entre los perfiles de LPS de los aislados de *P. gingivalis* de individuos sanos en comparación a los provenientes de individuos con periodontitis, y esto se encuentra correlacionado a diferencias encontradas en características macromorfológicas y de autoagregación entre los aislados clínicos.

Características de la envoltura celular, como una alta capacidad de formación de biopelículas, una alta hidrofobicidad, una baja carga negativa neta superficial, baja capacidad de autoagregación de aislados de *P. gingivalis*, estarían relacionadas a pacientes con una enfermedad periodontal muy avanzada y de gran severidad, y tendrían la capacidad de aumentar considerablemente la viabilidad de células epiteliales gingivales *in vitro*, lo cual sugiere posibles indicadores de mayor virulencia de una cepa determinada de este *P. gingivalis* y que deben ser estudiadas de manera más exhaustiva.

Si bien, el proceso de invasión, internalización, inhibición de la apoptosis celular de células epiteliales gingivales gatillado por *P. gingivalis* aún necesita ser estudiado en mayor profundidad, en este estudio se demostró que provoca un aumento de la viabilidad de las células OKF6/TERT2. Este efecto podría relacionarse con diferencias existentes en las propiedades de la envoltura celular de los aislados clínicos, como características de la producción del LPS.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aas, J., Paster, B., Stokes, L., Olsen, I., Dewhirst, F. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 43(11): 5721-5732.
2. Abusleme, L., Dupuy, A., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J., Strausbaug, L., Gamonal, J., Diaz, P. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal* 7: 1016–1025.
3. Allesen-Holm, M., Barken, K., Yang, L., Klausen, M., Webb, J., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* 59(4): 1114–1128.
4. Armitage, G. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology* 4(1): 1-6.
5. Armitage, G. C. (2004). The complete periodontal examination. *Periodontology* 2000 34: 22-23.
6. Asman, B., Gustafsson, A., Bergstrom, K. (1997). Priming response to inflammatory mediators in hyperreactive peripheral neutrophils from adult periodontitis. *Oral Diseases* 3(3): 167–171.
7. Bellon-Fontaine, M. N., Rault, J., Van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-

acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*.7: 47–53.

8. Bostanci, N., Belibasakis, G. (2012). *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 333(1): 1–9.
9. Byrne, S. J., Dashper, S. G., Darby, I. B., Adams, G. G., Hoffmann, B. & 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: 469-477.
10. Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2728-737.
11. Choi, J., Seymour, G. (2010). Vaccines against periodontitis: a forward looking review. *Journal of Periodontal & Implant Science* 40(4): 153-163.
12. Davey, M. E., Duncan, M. J. (2006). Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*. 188(15): 5510-5523.
13. Díaz, L., Hoare, A., Soto, C., Bugueño, I., Silva, N., Dutzan, N., Venegas, D., Salinas, D., Pérez-Donoso, J., Gamonal, J., Bravo, D. (2014) *Porphyromonas gingivalis* O-antigen profile correlates with virulence and polymyxin B resistance. *Journal of clinical periodontology*. Manuscrito en revisión.

14. Dickson, M., Hahn, W., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J., Weinberg, R., Louis, D., Li, F., Rheinwald, J. (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(4): 1436-1447.
15. Doyle, T., Burns, S., Contag, C. (2004). Technoreview: *In vivo* bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cellular Microbiology* 6(4): 303–317.
16. Drenkard, E., Ausubel, F. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740-743.
17. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35: 4495-516
18. Fadeel, B., Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine* 258(6): 479–517.
19. Gamonal, J., Mendoza, C., Espinoza, I., Muñoz, A., Urzua, I., Aranda, W., Carvajal, P. & Arteaga, O. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology* 81: 1403-1410.
20. Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F. & Murayama, Y. (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of Periodontology* 76: 2075- 2084.

21. González, S. (2013). La Infección por *Porphyromonas gingivalis* inhibe la apoptosis en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2. Tesis para optar al título de Bioquímico. Universidad de Santiago de Chile.
22. Götz, F., Fedtke, I., Peschel, A. (2004). Bacterial evasion of innate host defenses—the *Staphylococcus aureus* lesson. *International Journal of Medical Microbiology* 294(2–3): 189–194.
23. Grenier, D., Mayrand, D. (1987). Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity* 55(1): 111-117.
24. Gruenheid, S., Finlay, B. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422, 775-781.
25. Gualtero, D., Castellanos J. E., Perez G., Lafaurie, G. I. (2008). Purification of *Porphyromonas gingivalis* polysaccharide free lipopolysaccharide using Sephacryl S-200 high resolution chromatography. *Acta biológica Colombiana* 13(3): 149-162.
26. Haffajee, A., Cugini, M., Tanner, A., Pollack, R., Smith, C., Kent, R., Jr., Socransky, S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* 25(5): 346–353.

27. Hajishengallis, G., Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology* 27: 409–419.
28. Handfield, M., Mans, J., Zheng, G., Lopez, M., Mao, S., Progulsk-Fox, A., Narasimhan, G., Baker, H., Lamont, R. (2005). Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. *Cellular Microbiology* 7(6): 811–823.
29. Hancock, R., Sahl, S. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 24, 1551 – 1557.
30. Handley, P., Rickard, A., Gilbert, P., High, N., Kolenbrander, P. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology* 11(2): 94-100.
31. Häussler, S., Ziegler, I., Löttel, A., Götz, F., Rohde, M., Wehmhöner, D., Saravanamuthu, S., Tümmler, B., Steinmetz, I. (2003). Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology* 52(4): 295-301.
32. Herrera, G., Stijne-van, N., Bosch, T., Dentokom, M., Boersme, H., Zeiler, G., Winkelhoff, A. (1998). Microbiological Procedures with Periodontal Anaerobic Bacteria. Protocolo de trabajo. Laboratorio Microbiología, Facultad de Odontología, UCM, España.

33. Hiroi, M., Shimojima, T., Kashimata, M., Miyata, T., Takano, H., Takahama, M., Sakagami, H. (1998). Inhibition by *Porphyromonas gingivalis* LPS of apoptosis induction in human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *Anticancer Research* 18(5A): 3475-3479.
34. Holt S.C., Ebersole J.L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000 38: 72–122.
35. Inaba, H., Takeda, M., Ojima, M., Yoshioka, H., Kogo, M., Shizukuish, S., Nomura, M., Amano, A. (2006). Relationship of Serum Advanced Glycation End Products With Deterioration of Periodontitis in Type 2 Diabetes Patients. *Journal of Periodontology* 77(1): Pages 15-20.
36. Irshad, M., Van der Reijden, W., Crielaard, W., Laine, M. (2012). *In vitro* invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* 60(6): 469-476.
37. Jarnbring, F., Somogyi, E., Dalton, J., Gustafsson, A. & Klinge, B. (2002). Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 29: 1065-1071.

38. Jain, S., Darveau, R. P. (2010). Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology* 2000 54: 53-70.
39. Kimura, Y., Isaka, K., Kazama, F. (2011). Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource Technology* 102(6): 4390–4394.
40. Kooijman, R. (2006). Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17(4): 305–323.
41. Kuramitsu, H., Tokuda, M., Yoneda, M., Duncan, M., Clio, M. (1997). Multiple colonization defects in a cysteine protease mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 32(1): 140–142.
42. Laine, M., Appelmek, B., Van Winkelhoff, A. (1996). Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontology* 31(4): 278-284.
43. Laine, M., Appelmek, B., Van Winkelhoff, A. (1997). Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *Journal of Dental Research* 76(12): 1840-1844.
44. Lamont, R., Jenkinson, H. (1998). Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4): 1244–1263.

45. Li, S., Zhang, D., Chen, L., Gu, Z., Yan, J. (2008). Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity* 14(2): 99-107.
46. Loesche, W., Grossman, N. (2001). Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews* 14(4): 727-752.
47. Lopez, N., Haffajee, A., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Socransky, S. (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* 31(11): 996–1002.
48. Madianos, M., Papapanou, P., Sandros, J. (1997). *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infection and Immunity* 65(10): 3983-3990.
49. Marolda, C. L., Lahiry P., Vinés, E., Saldías, S., Valvano, M. A. (2006). Micromethods for the Characterization of Lipid A-Core and O-Antigen Lipopolysaccharide. *Methods in Molecular Biology* 347: 237-252.
50. Martinić, M., Hoare, A., Contreras, I., Álvarez, S. A. (2011). Contribution of the Lipopolysaccharide to Resistance of *Shigella flexneri* 2a to Extreme Acidity. *PLoS One* 6(10): e25557.

51. Mao, S., Park, Y., Hasegawa, Y., Tribble, G. D., James, C. E., Handfield, M., Stavropoulos, M. F., Yilmaz, O. & Lamont, R. J. (2007). Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology* 9: 1997-2007.
52. Mckee, A., Mcdermid, A., Wait, R., Baskerville, A., Marsh, P. (1988). Isolation of colonial variants of *Bacteroides gingivalis* W50 with a reduced virulence. *Journal of Medical Microbiology* 27(1): 59-64.
53. Murray, D. A., Wilton, J. M. (2003). Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of HL60-derived neutrophils in vitro. *Infection and Immunity* 71: 7232-7235.
54. Nakhjiri, S., Park, Y., Yilmaz, O., O Chung, W., Watanabe, K., El-Sabaeny, A., Park, K., Lamont, R. (2001). Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters* 200(2): 145–149.
55. Narimatsu, M., Noiri, Y., Itoh, S., Noguchi, N., Kawahara, T., Ebisu, S. (2004). Essential Role for the *gtfA* Gene Encoding a Putative Glycosyltransferase in the Adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*. 72(5): 2698-2702.
56. Noiri, Y., Ozaki, K., Nakae, H., Matsuo, T., Ebisu, S. (1997). An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *Journal of Periodontal Research* 32(7): 598–607.

57. Oda, D. & Watson, E. (1990). Human oral epithelial cell culture I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26: 589-595.
58. O'Toole, G., Kaplan, H., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54: 49-79.
59. Pan, C., Xu, X., Tan, L., Lin, L., Pan, Y. (2013). The effects of *Porphyromonas gingivalis* on the cell cycle progression of human gingival epithelial cells. *Oral Diseases* doi 10.1111/odi.12081.
60. Papapanou, P. N., Sandros, J., Lindberg, K., Duncan, M. J., Niederman, R. & Nannmark, U. (1994). *Porphyromonas gingivalis* may multiply and advance within stratified human junctional epithelium in vitro. *Journal of Periodontal Research* 29: 374-375.
61. Park, J., Kim, K., Choi, K., Grab, D., Dumle, J. (2004). *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cellular Microbiology* 6(8): 743–751.
62. Pathirana R. D., O'Brien-Simpson N.M. y Reynolds E.C. (2010). Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology* 2000 52: 218-237.

63. Petersen, P., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 83(9): 9642-9686.
64. Raetz, C., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of biochemistry* 71: 635-700.
65. Rosenberg, M., Buivids, I., Ellen, R. (1991). Adhesion of *Actinomyces viscosus* to *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*-coated hexadecane droplets. *Journal of Bacteriology* 173(8): 2581-2589.
66. Sandros, J., Papapanou, P., Nannmark, U., Dahlén, G. (1994). *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*. *Journal of Periodontal Research* 29(1): 62–69.
67. Sbordone, L., Bortolaia, C. (2003). Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical Oral Investigations* 7(4): 181-188.
68. Schifferle, R. E., Reddy, M. S., Zambon, J. J., Genco, R. J., Levine M. J. (1989). Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Immunology* 143: 3035-3042.
69. Schlumberger, M., Hardt, W. (2006). *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Current Opinion in Microbiology* 9(1): 46–54

70. Scudiero D., Shoemaker R., Paull K., Monks A., Tierney S., Nofziger T., Currens M., Seniff D., Boyd M. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 48, 4827-4833.
71. Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M. & other authors (2008). Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 206-214.
72. Singh, A., Wyant, T., Anaya-Bergman, C., Aduse-Opoku, J., Brunner, J., Laine, M., Curtis, M., Lewis, J. (2011). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infection and Immunity* 79(11): 4533-42.
73. Slots, J., Bragd, H., Wikström, M., Dahlen, G. (1986). The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *Journal of Clinical Periodontology* 13(6): 570–577.
74. Slots, J., Rams, T., Feik, D., Young, V., Hammond, B. (1992). Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* 7(4): 249–252.

75. Slots, J., Ashimoto, A., Flynn, M. J., Li, G., Chen, C. I. (1995). Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clinical Infectious Diseases* 20(2): 304-307.
76. Socransky, S., Haffajee, A. (1991). Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *Journal of Periodontal Research* 26(3): 195–212.
77. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., Kent, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25: 134-44.
78. Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 38: 135–187.
79. Stathopoulou, P.G., Galicia, J. C., Benakanakere, M.R., García, C.A., Potempa, J. y Kinane, D.F. (2009). *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiology*, 9: 107 doi:10.1186/1471-2180-9-107.
80. Syed, S., Loesche, W. (1978). Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. *Infection and Immunity* 21: 821-829.

81. Takeda, J., Sasaki, H., Suzuki, N., Kent, R., Kawashima, N., Stashenko, P. (2008). T-Cell Response Mediated by Myeloid Cell-Derived IL-12 Is Responsible for *Porphyromonas gingivalis* Induced Periodontitis in IL-10-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 180(9): 6193-6198.
82. Tribble, G., Lamont, R. (2010). Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology* 2000 52(1): 68–83.
83. Tsai, C., Frasch, C. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 119(1): 115–119.
84. Umeda JE, Missailidis C, Longo PL, Anzai D, Wikström M, Mayer MP (2006). Adhesion and invasion to epithelial cells by fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* 21(6): 415-419.
85. Urnowey, S., Ansai, T., Bitko, V., Nakayama, K., Takehara, T., 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.
86. Van Steenberghe, T., Delemarre, F., Namavar, F., de Graaff, J. (1987). Differences in virulence within the species *Bacteroides gingivalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53(4): 233-244.

87. Vernal, R., León, R., Silva, A., Van Winkelhoff, A., Garcia-Sanz, J., Sanz, M. (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology* 36(10): 823-829.
88. Vitkov, L., Krautgartner, W., Hannig, M. (2005). Bacterial internalization in periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* 20(5): 317–32
89. Wang, J, Lu, Z., Wientjes, M., Au, J. (2010). Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 12(4): 492-503.
90. Wang, J., Qi, J., Zhao, H., Zhang, I., Wei, S., Zhao, F. (2013). Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports* DOI: 10.1038/ srep 01843.
91. Yamaguchi, M., Sato, K., Yukitake, H., Noiri, Y., Ebisu, S., Nakayama, K. (2010). A *Porphyromonas gingivalis* Mutant Defective in a Putative Glycosyltransferase Exhibits Defective Biosynthesis of the Polysaccharide Portions of Lipopolysaccharide, Decreased Gingipain Activities, Strong Autoaggregation, and Increased Biofilm Formation. *Infection and Immunity* 78(9): 3801-3812.
92. Yang, E., Tanner, A., Milgrom, P., Mokeem, S., Riedy, C., Spadafora, A., Page, R., Bruss, J. (2002). Periodontal pathogen detection in gingiva/tooth

and tongue flora samples from 18- to 48-month-old children and periodontal status of their mothers. *Oral Microbiology and Immunology* 17(1): 55–59.

93. Yilmaz, O., Watanabe, K., Lamont, R. J. (2002). Involvement of integrins in fimbria-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology* 4: 305-314.
94. Yilmaz, O., Young, P. A., Lamont, R. J., Kenny, G. E. (2003). Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology* 149: 2417-2426.
95. Yilmaz, O., Jungas, T., Verbeke, P., Ojcius, D. M. (2004). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 72: 3743-3751.
96. Yilmaz, O., Verbeke, P., Lamont, R. J., Ojcius, D. M. (2006). Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infection and Immunity* 74: 703-710.
97. Yilmaz, O., Sater, A. A., Yao, L., Koutouzis, T., Pettengill, M., Ojcius, D. M. (2010). ATP-dependent activation of an inflammasome in primary gingival epithelial cells infected by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology* 12: 188-198.

98. Zaric, S., Shelburne, C., Darveau, R., Quinn, D., Weldon, S., Taggart, C., Coulter, W. (2010). Impaired Immune Tolerance to *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide promotes Neutrophil Migration and Decreased Apoptosis. *Infection and Immunity* 78(10): 4151-4156.
99. 1999 International workshop for a classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999, 1999

9. ANEXOS.

ANEXO N°1 CLASIFICACIÓN DE PERIODONTITIS (ARMITAGE)

<ul style="list-style-type: none"> II. Chronic Periodontitis† <ul style="list-style-type: none"> A. Localized B. Generalized III. Aggressive Periodontitis† <ul style="list-style-type: none"> A. Localized B. Generalized IV. Periodontitis as a Manifestation of Systemic Diseases <ul style="list-style-type: none"> A. Associated with hematological disorders <ul style="list-style-type: none"> 1. Acquired neutropenia 2. Leukemias 3. Other B. Associated with genetic disorders <ul style="list-style-type: none"> 1. Familial and cyclic neutropenia 2. Down syndrome 3. Leukocyte adhesion deficiency syndromes 4. Papillon-Lefèvre syndrome 5. Chediak-Higashi syndrome 6. Histiocytosis syndromes 7. Glycogen storage disease 8. Infantile genetic agranulocytosis 9. Cohen syndrome 10. Ehlers-Danlos syndrome (Types IV and VIII) 11. Hypophosphatasia 12. Other C. Not otherwise specified (NOS) V. Necrotizing Periodontal Diseases <ul style="list-style-type: none"> A. Necrotizing ulcerative gingivitis (NUG) B. Necrotizing ulcerative periodontitis (NUP) VI. Abscesses of the Periodontium <ul style="list-style-type: none"> A. Gingival abscess B. Periodontal abscess C. Pericoronal abscess 	<ul style="list-style-type: none"> VII. Periodontitis Associated With Endodontic Lesions <ul style="list-style-type: none"> A. Combined periodontic-endodontic lesions VIII. Developmental or Acquired Deformities and Conditions <ul style="list-style-type: none"> A. Localized tooth-related factors that modify or predispose to plaque-induced gingival diseases/periodontitis <ul style="list-style-type: none"> 1. Tooth anatomic factors 2. Dental restorations/appliances 3. Root fractures 4. Cervical root resorption and cemental tears B. Mucogingival deformities and conditions around teeth <ul style="list-style-type: none"> 1. Gingival/soft tissue recession <ul style="list-style-type: none"> a. facial or lingual surfaces b. interproximal (papillary) 2. Lack of keratinized gingiva 3. Decreased vestibular depth 4. Aberrant frenum/muscle position 5. Gingival excess <ul style="list-style-type: none"> a. pseudopocket b. inconsistent gingival margin c. excessive gingival display d. gingival enlargement (See I.A.3. and I.B.4.) 6. Abnormal color C. Mucogingival deformities and conditions on edentulous ridges <ul style="list-style-type: none"> 1. Vertical and/or horizontal ridge deficiency 2. Lack of gingiva/keratinized tissue 3. Gingival/soft tissue enlargement 4. Aberrant frenum/muscle position 5. Decreased vestibular depth 6. Abnormal color D. Occlusal trauma <ul style="list-style-type: none"> 1. Primary occlusal trauma 2. Secondary occlusal trauma
--	--

Gary C. Armitage. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions.

ANEXO N°2



MAT.:Recepción trabajo de Investigación
para evaluación del Comité de Ética.

SANTIAGO, 26 de abril de 2011

Prof. Dra.
Denisse Bravo Rodríguez
Investigador Responsable
Presente

De mi consideración:

Informo a usted que se ha recepcionado Proyecto de Investigación titulado "*Papel del LPS de P. Gingivalis en la persistencia en células epiteliales gingivales y la progresión de la periodontitis crónica por el aumento de survivina*", enviado por usted, para ser analizado por el Comité de Ética de nuestra Facultad.

Sin otro particular, le saluda atentamente,


PROF. DRA JUAN CORTÉS A.
VICEDECANO
PRESIDENTE COMITÉ DE ÉTICA



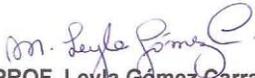
C.c.: Archivo
FOCS/vrd.

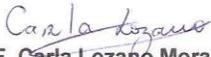


C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Iniciación en Investigación FONDECYT 2011 titulado "**Role of *P. gingivalis* LPS in promoting persistence in gingival epithelial cells and progression of chronic periodontitis by upregulation of survivin**" del cual la Dra. Denisse Bravo Rodríguez es la Investigadora Responsable. Dicho proyecto cuenta con las normas de bioseguridad, y la investigadora se compromete a velar por el cumplimiento de ellas, durante el desarrollo de éste.

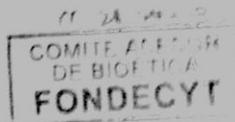
Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Denisse Bravo Rodríguez para los fines que estime convenientes.


PROF. Leyla Gómez Carranza
 Secretaria


PROF. Carla Lozano Moraga
 Presidenta



Santiago, Abril 26 de 2011.



Las muestras de sangre periférica y de fluido gingival crevicular, normalmente no se toman a los pacientes que se someten a tratamiento periodontal, pero la información que estos exámenes pueden entregar son de mucha utilidad, para conocer la biología de la infección periodontal.

Los sujetos sin periodontitis, son voluntarios, a los cuales producto de la extracción de los terceros molares, se les procederá a tomar una muestra de tejido gingival, y de fluido gingival crevicular.

Todos los procedimientos de toma de muestras son sin costo para los pacientes y sin costo para los sujetos sanos, sin periodontitis.

Para el éxito del tratamiento periodontal es necesario hacer controles periódicos, con el objetivo de controlar la placa supragingival, de tal manera que se harán controles a los 3, 6 y 12 meses después del tratamiento periodontal.

Todas las muestras se almacenarán en un congelador menso 80 grados, hasta realizar los análisis correspondientes.

Todas las muestras biológicas tomadas en el presente estudio (biopsia, fluido gingival crevicular) solo se usarán en el presente estudio. Lo usual es que la cantidad de muestras tomadas solo alcanza para hacer los análisis correspondientes, siendo imposible poder guardar algo de material biológico.

Ventajas de participar en el estudio

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les hará entrega de todos los elementos necesarios para el higiene bucal (cepillo dentario, cepillo interproximal, seda y enjuagatorios).

Otra ventaja es que se les dará a conocer y se consignará en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

En relación con el tratamiento periodontal, en el tratamiento realizado por el suscrito, se hará una rebaja de un 50% del arancel que la Facultad tiene dispuesto cobrar para tales efectos.

A los pacientes sanos, se les regalará un set de higiene bucal.

Desventajas de participar en el estudio

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma de una biopsia (realizada durante la misma sesión del tratamiento y por tanto se hace con anestesia), de fluido gingival crevicular (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente) y una muestra de sangre periférica tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología.

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable Jorge Garmonal, son: 9781839, 9781838, y 2324232.

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mí entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el

[Handwritten signature]

Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Omar Campos, en el fono 9781702

Además se me ha aclarado, que en caso de no dar mi consentimiento, el profesional procederá de todas maneras a realizar el mencionado tratamiento periodontal

Identificación Paciente

Nombre:

Rut:

Fono:

Identificación Dentista

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma

Firma

Fecha:

Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ■ 9781839/Casilla 1903

93
L. J. Jackson

