



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO
DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

**SUSCEPTIBILIDAD DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*
PROVENIENTE DE PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA A LOS
PÉPTIDOS CATIÓNICOS POLIMIXINA B Y BETA DEFENSINAS
HUMANAS-1, -2, -3, Y -4 Y EL POSIBLE PAPEL DEL
LIPOPOLISACÁRIDO EN SU RESISTENCIA**

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

Por:

LEONOR ANDREA DEL CARMEN DÍAZ VELIS

**Director de Tesis
Dr. Jorge Gamonal**

**Co-Directoras de Tesis
Prof. Nora Silva Dra. Denisse Bravo**

SANTIAGO-CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

Leonor Andrea del Carmen Díaz Velis

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de del 2016.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Gamonal

Co-Directoras de Tesis:

Prof. Nora Silva

Dra. Denisse Bravo

Comisión Informante:

Dra. María A. Valenzuela (Presidente)

Dra. Inés Contreras

Dr. Rodrigo Giacaman

Dr. Remigio López

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Microbiología Oral, Área de Microbiología, Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile y se desarrolló gracias al financiamiento otorgado por los siguientes proyectos:

Financiamiento otorgado al Dr. Jorge Gamonal A.

1. FONDECYT 1090046
2. FONDECYT 1130570

Financiamiento otorgado a la Dra. Denisse Bravo R.

1. FONDECYT 11110076.
2. Proyecto U-inicia 11/10.

PUBLICACIÓN

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

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

NACIONALES

Bugueño I., Venegas D., Soto C., Salinas D., Dutzan N., **Díaz L.**, Hoare A., Bravo D. "Effect of cell envelope of different *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates on viability of Gingival Epithelial Cells". XII PABMB Congress. 9 - 14 de Noviembre del 2013. Puerto Varas – Chile.

Soto C., **Díaz L.**, Fuentes A., Salinas D., Venegas D., Dutzan N., Hoare A., Bravo D. "Genetic and Structural analysis of *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide and its role in antimicrobial compounds resistance". XII PABMB Congress. 9 - 14 de Noviembre del 2013. Puerto Varas – Chile.

Arias J., Meléndez M, **Díaz L.**, Saavedra J., Vernal R., Contreras J., Hernández P “Serotipificación de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en periodontitis”. XXV Reunión Anual de IADR División Chile. 07 – 08 de Octubre del 2013. Santiago – Chile.

Bugueño I., **Díaz L.**, Venegas D., Hoare A., Bravo D. “Caracterización macromorfológica y de envoltura celular de aislados clínicos y cepas de referencia de *Porphyromonas gingivalis*”. XXV Reunión Anual de IADR División Chile. 07 – 08 de Octubre del 2013. Santiago – Chile.

Soto C., **Díaz L.**, Bugueño I., Salinas D., Venegas D., Dutzan N., Hoare A., Bravo D. “Role of Lipopolysaccharide and capsule of *Porphyromonas gingivalis* in resistance to antimicrobial compounds”. Joint Symposium Sydney-Santiago: Topics in Modern Infectious Diseases. 3 de Junio del 2013. Santiago - Chile.

Soto C., **Díaz L.**, Hoare A., Perez-Donoso J., Bravo D. “Efecto del telurito como potenciador de antibióticos sobre *P. gingivalis*”. XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. 23 - 26 de Noviembre del 2012. Valdivia - Chile.

Díaz L., Bravo D., Silva N., Hoare A., Camus V., Soto C., Venegas D., Dutzan N. y J. Gamonal. “Susceptibilidad a Polimixina B de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* y su relación con el lipopolisacárido” (Polymyxin B susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates and its lipopolysaccharide relationship). XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. 23 - 26 de Noviembre del 2012. Valdivia - Chile.

INTERNACIONALES

Bugueño I. M., Dutzan N., Hoare A., **Díaz L.**, Soto C., Lobos I., Salinas D., Venegas D., y Bravo D. “*Porphyromonas gingivalis* Surface Virulence Factors and Gingival Epithelial Cells Viability”. IADR General Session and Exhibition. 25 – 28 Junio del 2014. Cape Town - Sudáfrica.

Díaz L., Bravo D., Silva N., Hoare A., Soto C., Venegas D, Gamonal J. “Papel del lipopolisacárido de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* en la susceptibilidad a Polimixina B” (Role of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide from clinical isolates in susceptibility to Polymyxin B). LUGAR: Área de Microbiología. Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. XLV Reunión Anual de la

Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. 8 – 10 de Noviembre del 2012.
Córdoba - Argentina.

Bravo D., Lobos I., **Díaz L.**, Soto C., Camus V., Venegas D., Pérez-Donoso J.
“Mecanismos de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*: un enemigo silencioso”.
Conferencia a cargo de Ph.D. Denisse Bravo Rodríguez Universidad de Chile. 24 - 28 de
Septiembre del 2012. Ica – Perú.

*A mis grandes amores,
Rocío y Marco
Por darme alas y raíces*

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis y todo el trabajo realizado durante estos años a mi querida Rocío. Tú me diste la razón y fortaleza para terminar esta gran tarea.

Quiero agradecer a mi querido esposo Marco, por todo su apoyo incondicional desde antes del comienzo. Supiste comprenderme, animarme y tener paciencia en mis momentos difíciles.

Agradezco a mis padres y hermano por estar presente. Mamá, gracias por tu compañía y ayuda. Leonardo, a ti dedico en gran parte mis logros académicos. Siempre has sido un gran ejemplo.

Muchas gracias a mis tutores Nora Silva, Denisse Bravo y Jorge Gamonal, y a mi co-tutora subrogante Anilei Hoare, no sólo por dirigir este trabajo, sino también por haberme incentivado a desarrollar mis habilidades científicas y entregarme los conocimientos en este proceso.

También quisiera agradecer a los miembros de mi comisión de tesis: Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Inés Contreras, Dr. Rodrigo Giacaman y Dr. Remigio López. Gracias por su importante participación y aporte durante el desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer a los miembros del laboratorio que contribuyeron con esta tesis, apoyando y aportando personal y experimentalmente. Me refiero a Darna Venegas y Daniela Salinas, quienes me acompañaron en el desarrollo de mis experimentos de los cuales todos aprendimos. A Christopher Soto, Ignacio Lobos e Isaac Bugueño, con quienes trabajé muy a gusto y colaboramos en diversas cosas. A Nicolás Dutzan por tomarnos las muestras y darse siempre el tiempo para explicarme la parte odontológica. Al Dr. Sergio Álvarez por ayudarme con las densitometrías. A Andrés Barriga por su ayuda incondicional con las espectrometrías de masa. A Jocelyn García, Leslie Henríquez, Jocelyn Arias y Pablo Ahumada por permitirme trabajar en el laboratorio de Periodoncia cuando era necesario. A Carla Lozano y Claudia Lefimil por aclarar mis dudas en los pasillos y ayudarme con las secuenciaciones. A Andrea Cortés y Katherine Vera por los buenos momentos celebrados y también los llorados. A Rolando Vernal por

subirme el ánimo y permitirme trabajar cuando lo necesité. A todos Ustedes les agradezco con mucho cariño su ayuda y el que hayamos podido compartir tantos momentos buenos como malos.

A mis amigos en el laboratorio de la Dra. María Antonieta Valenzuela: Yessica Pulgar, Javiera Reyes, María Elsa Pando, Sebastián Quintremil y Matías Rivera. Agradezco con cariño la acogida durante mi estadía en el laboratorio, por enseñarme muchas cosas, por celebrarlo todo y por el apoyo en momentos complicados.

No dejo de mencionar a mis queridos amigos y compañeros de doctorado, especialmente a Rina Ortiz. Mucho éxito!

Para mí es muy importante el aporte de cada uno de Ustedes, tanto en lo académico como en lo personal. Por fin, puedo decirles con mucha emoción:

¡LO LOGRÉ!

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Página
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
SUMMARY	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La enfermedad periodontal: Periodontitis	1
1.2. Barrera epitelial oral	2
1.3. Las beta defensinas humanas	2
1.3.1. Las beta defensinas humanas en la cavidad oral	3
1.4. <i>P. gingivalis</i> y periodontitis	4
1.5. <i>P. gingivalis</i> y las beta defensinas humanas en las cavidad oral	4
1.6. Factores de virulencia de <i>P. gingivalis</i> relacionados con la resistencia a péptidos catiónicos	5
1.6.1. LPS de <i>P. gingivalis</i>	6
1.6.1.1. LPS de <i>P. gingivalis</i> y las beta defensinas humanas	9
1.7. Resumen de los antecedentes:	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. METODOLOGÍA	13
2.1. Materiales	13
2.1.1. Cepas bacterianas	13
2.1.2. Cultivos bacterianos	13
2.1.3. Reactivos Generales	14

2.1.4. Anticuerpos	15
2.1.5. Reactivos utilizados para biología molecular	15
2.1.6. Reactivos utilizados en el análisis del lipopolisacárido	16
2.2. Métodos	17
2.2.1. Obtención de los aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> .	17
2.2.2. Ensayos de biología molecular.	19
2.2.3. Ensayos de actividad antimicrobiana.	20
2.2.4. Análisis del lipopolisacárido.	22
2.2.5. Análisis del lípido A.	25
2.2.6. Análisis estadístico	27
3. RESULTADOS	28
3.1. OBJETIVO 1: Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido catiónico PMB sobre aislados de <i>P. gingivalis</i> de individuos periodontalmente sanos y pacientes con periodontitis crónica.	28
3.1.1. Obtención de la muestra microbiológica a partir de biopelícula de placa subgingival de individuos sanos y de pacientes con periodontitis crónica moderada a severa.	28
3.1.2. Aislamiento e identificación de <i>P. gingivalis</i> a partir de las muestras microbiológicas obtenidas.	29
3.1.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de PMB sobre los aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> obtenidos.	30
3.2. OBJETIVO 2: Determinar el papel de la fosforilación en la posición 4' del lípido A del LPS en la resistencia de <i>P. gingivalis</i> a PMB y las hBDs-1 a -4.	32
3.2.1. Asociación de la presencia del gen que codifica para la fosfatasa 4' del lípido A, <i>PGN_0524</i> , con la resistencia de los aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> frente a PMB.	32
3.2.2. Determinación de la presencia de la fosforilación en la posición 4' del lípido A de los aislados.	33
3.2.3. Evaluación del crecimiento relativo de la cepa de referencia ATCC 33277 y Δ PG1587 en presencia de las hBDs-1 a -4.	37
3.3. OBJETIVO 3: Determinar el papel de otras regiones del LPS en la resistencia de los aislados de <i>P. gingivalis</i> a PMB y las hBDs-	39

1 a -4.	
3.3.1. OBJETIVO 3.1: Analizar la región del AgO del LPS de los aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> .	39
3.3.2. OBJETIVO 3.2: Analizar el polisacárido aniónico del LPS de la cepa de referencia y aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> .	43
4. DISCUSIÓN	45
5. CONCLUSIONES	51
6. ANEXOS	52
7. BIBLIOGRAFÍA	64

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Composición estructural de la membrana de bacterias Gram negativo y del LPS.	7
Figura 2	Estructuras del lípido A del LPS de <i>P. gingivalis</i>	9
Figura 3	Ensayos de susceptibilidad de los aislados clínicos a Polimixina B.	31
Figura 4	Identificación del gen codificante de la fosfatasa 4' del lípido A (<i>PGN_0524</i>).	33
Figura 5	Espectro de masas (MS) representativo.	36
Figura 6	Espectros de fragmentación (MS ²) representativos observados para las señales m/z 1766, 1475, 1186 y 1157.	37
Figura 7	Crecimiento relativo de la cepa de referencia ATCC 33277 y Δ PG1587 <i>versus</i> concentraciones crecientes de las beta defensinas humanas (hBDs) -1, -2, -3 y -4.	38
Figura 8	Perfiles de LPS de aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> de pacientes con P. crónica, de individuos sanos, y de la cepa de referencia.	41
Figura 9.	Análisis densitométrico del LPS de aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> de pacientes con P. crónica, de individuos sanos, y de la cepa de referencia.	42
Figura 10	Identificación del A-LPS en aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> de pacientes con P. crónica e individuos sanos.	43
Figura 11	Resumen con los principales resultados obtenidos.	50
Figura anexa 1	Control de carga de los perfiles de LPS de aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i> de pacientes con P. crónica y cepa de referencia <i>versus</i> individuos sanos.	69
Figura anexa 2	Imagen representativa de los perfiles de LPS de diferentes aislados clínicos de <i>P. gingivalis</i>	70

provenientes de un mismo paciente con P. crónica o de individuos sanos.

Figura anexa 3	Esquema estructural del lípido A 1,4' di-fosforilado y penta-acilado de <i>P. gingivalis</i> .	71
Tabla		Página
Tabla 2.1.1	Cepas bacterianas	13
Tabla 2.1.2	Lista de materiales y reactivos de cultivo bacterianos	13
Tabla 2.1.3	Lista de reactivos de uso general.	14
Tabla 2.1.4	Anticuerpos utilizados	15
Tabla 2.1.5	Lista de reactivos para biología molecular	15
Tabla 2.1.6	Lista de partidores utilizados para la identificación y gen de la fosfatasa en 4' (<i>PGN_0524</i>) de <i>P. gingivalis</i>	16
Tabla 2.1.7	Lista de reactivos para el análisis del LPS	16
Tabla 2.2.1	Criterios para la inclusión o exclusión de individuos sanos y pacientes con P. crónica.	18
Tabla 3.1	Características clínicas de los pacientes con P. crónica e individuos sanos utilizados.	29
Tabla 3.2	Susceptibilidad de los aislados clínicos, de pacientes con P. crónica e individuos sanos, cepa de referencia (ATCC 33277) y mutante (Δ PG1587) a PMB en ensayos de difusión radial.	33
Tabla 3.3	Determinación de la presencia de especies de lípido A en aislados clínicos de pacientes con P. crónica (CP1-4) e individuos sanos (H1-3), cepa de referencia (ATCC 33277) y mutante (Δ PG1587).	34
Tabla anexa 6.1	Características clínicas de los pacientes con P. crónica e individuos sanos reclutados.	64
Tabla anexa 6.2	Resumen de los resultados para la identificación de <i>P. gingivalis</i> a partir de pacientes con P. crónica (CP) e individuos sanos (H) reclutados en este estudio.	65
Tabla anexa 6.3	Resultado de los análisis de los ensayos de susceptibilidad de los aislados clínicos <i>versus</i> la cepa de referencia ATCC 33277 para cada concentración de PMB (0–275 μ g/mL) ensayada.	66

Tabla anexa 6.4	Especies de lípido A descritas para <i>P. gingivalis</i> . Para cada especie se indica su fórmula, su masa nominal (Mn), masa promedio (Mp), masa monoisotópica (Mi) y su correspondiente señal m/z (*).	67
Tabla anexa 6.5	Resultado de los análisis de los ensayos de susceptibilidad de la cepa de referencia ATCC 33277 para <i>versus</i> la mutante Δ PG1587 en presencia de la hBDs-1 a -4 (0–20 μ g/mL).	68

ABREVIATURAS

AgO:	Antígeno O
A-LPS:	Lipopolisacárido
APS:	Polisacárido aniónico
BOP:	Sangrado al sondaje
DO	Densidad óptica
Erm:	Eritromicina
Erm ^r :	Resistencia a eritromicina
EtOH:	Etanol
H ₂ O _d :	Agua destilada
hBD-1:	Beta defensina humana 1
hBD-2:	Beta defensina humana 2
hBD-3:	Beta defensina humana 3
hBD-4:	Beta defensina humana 4
KDO:	2-ceto-3-deoxioctanato
LPS:	Lipopolisacárido
m/z:	masa/carga
mA	miliamper
N ó n:	Número de ensayos o de individuos
NIC:	Nivel de inserción clínico
O-LPS:	Lipopolisacárido
P. crónica:	Periodontitis crónica
<i>P. gingivalis</i> :	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pb:	pares de bases
PCR:	Reacción de la polimerasa en cadena
<i>PGN_0524</i> :	gen de la fosfata 4' del lípido A
PMB:	Polimixina B
PS:	Profundidad de sondaje
RTF:	Medio de transporte fluido reducido
UA:	Unidades de absorbancia
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta
V:	Volt

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa con un componente inflamatorio crónico que se produce como resultado del desbalance entre los microorganismos que conforman la biopelícula subgingival y la respuesta inmune del hospedero. La colonización de microorganismos patógenos y la respuesta inmunológica desencadenada que conducen a la destrucción de los tejidos de inserción de los dientes, como son el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento radicular, resultan finalmente en la pérdida de dientes.

La presencia de bacterias anaerobias Gram-negativo específicas en la biopelícula subgingival es relevante en la etiología y progresión de la periodontitis. Dentro de ellas *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es considerada un patógeno “clave” en el inicio de la enfermedad periodontal. A pesar de presentarse en una baja abundancia en sitios enfermos comparado con la microbiota oral total, esta bacteria es capaz de inducir cambios en el microbioma oral y causar disbiosis, conduciendo al desarrollo de la periodontitis. *P. gingivalis* además, es la bacteria más frecuentemente aislada en pacientes con periodontitis crónica (*P. crónica*) y ha sido relacionada con la progresión de esta enfermedad. No obstante, no está claro por qué su presencia en individuos sanos no se asocia con la enfermedad y los mecanismos que utiliza para el desarrollo y/o progresión de la periodontitis tampoco han sido totalmente dilucidados.

Entre los factores de virulencia de *P. gingivalis*, el LPS destaca por su variabilidad estructural la cual le otorga la capacidad de dirigir e incluso evadir la respuesta inmunológica del hospedero, así como la actividad antimicrobiana de los péptidos endógenos, como es el caso de las defensinas (hBDs). *P. gingivalis* es capaz de reducir su interacción electrostática con péptidos catiónicos como Polimixina B (PMB), incrementando su resistencia por una de-fosforilación mediada por una fosfatasa en la posición 4' del lípido A (gen *PGN_0524*). Junto con modificar su lípido A, *P. gingivalis* sintetiza dos tipos de LPS (A-LPS y O-LPS) que difieren en la región del Antígeno O polimérico (APS y AgO, respectivamente). Varios estudios sugieren que el lípido A es relevante en la resistencia a PMB, sin embargo su relación con la resistencia a otros péptidos catiónicos presentes en la cavidad oral (hBDs) no ha sido estudiada, así como

tampoco se conoce el rol que pudieran tener otras estructuras del LPS, como el APS y AgO en dicha resistencia.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se propuso determinar la susceptibilidad de aislados clínicos de *P. gingivalis*, provenientes de individuos clínicamente diagnosticados con periodontitis crónica (P. crónica) e individuos periodontalmente sanos, en presencia de PMB y evaluar la participación de la fosfatasa 4' del lípido A de *P. gingivalis* en la resistencia a PMB y las hBDs-1 a -4. Además, se evaluó el rol de otras regiones del LPS como el AgO y/o APS en la resistencia a péptidos catiónicos, utilizando como modelo la PMB.

Nuestros resultados muestran que aislados de *P. gingivalis* de pacientes con P. crónica presentan mayor resistencia a PMB respecto a aquellos obtenidos de individuos sanos. Además, aislados de individuos sanos son significativamente menos susceptibles a PMB respecto de la cepa de referencia ATCC 33277. Si bien una mutante que carece del gen de la fosfatasa en la posición 4' del lípido A es totalmente susceptible a PMB, la presencia de este gen en los aislados no se correlaciona con la resistencia diferencial observada, ya que todos los aislados presentaban el gen. Más aún, en el análisis estructural del lípido A de los aislados se demostró la presencia de estructuras fosforiladas en la posición 4', tanto en aislados susceptibles como resistentes a PMB, indicando que la composición del lípido A de *P. gingivalis* no es el único factor determinante en la resistencia de los aislados clínicos a PMB, y muy probablemente frente a otros péptidos catiónicos, puesto que la mutante fue capaz de crecer incluso a las concentraciones más altas de las hBDs-1 a -4. Aislados de individuos sanos carecen de moléculas de AgO de alto peso molecular y APS, sugiriendo que *P. gingivalis* presente en individuos periodontalmente sanos no produce A-LPS o lo pierde. Finalmente, aislados de pacientes con P. crónica carecen de moléculas de APS de bajo peso molecular, sugiriendo que moléculas de AgO y APS de alto peso molecular son relevantes en la resistencia diferencial de *P. gingivalis* a los péptidos catiónicos PMB y hBDs-1 a -4.

SUMMARY

Periodontitis is an infectious disease with a chronic inflammatory component that occurs as result from imbalance between microorganisms forming biofilm and subgingival host immune response. Pathogenic microorganisms colonization and the immune response elicited lead to destruction of teeth insertion tissue such as: alveolar bone, periodontal ligament and cementum, finally resulting in tooth loss.

The presence of specific Gram-negative anaerobic bacteria in subgingival biofilm is relevant for the etiology and progression of periodontitis. Among them, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) is a "key" pathogen for the onset of periodontal disease. Although present in diseased sites in low abundance compared to the total oral microbiota, this bacterium is able to induce changes in the oral microbiome and cause dysbiosis, leading to development of periodontitis. *P. gingivalis* is the bacteria most frequently isolated in patients with chronic periodontitis and has been linked to progression of disease. However, it is unclear how their presence in healthy individuals is not associated with disease and the mechanisms for the development and/or progression of periodontitis have not been completely understood.

Among *P. gingivalis* virulence factors the LPS noted for its structural changes conferring the ability to orchestrate and subvert the host immune response, and to resist endogenous peptides antimicrobial activity, such as defensins (hBDs). *P. gingivalis* reduces its electrostatic interaction with cationic peptides as Polymyxin B (PMB) and increases resistance by phosphatase lipid A 4' dephosphorylation (*PGN_0524* gene). Besides modify their lipid A, *P. gingivalis* synthesizes two different types of LPS (A-LPS and O-LPS) differing at region of polymeric O antigen (OAg and APS, respectively). Several studies suggest that relevance for lipid A in PMB resistance, but its relationship with other cationic peptides resistance, relevant in the oral cavity (hBDs) has not been studied, and the possible role for the other known structures in LPS, such as APS and OAg in resistance.

By the above, the present work proposed to determine the susceptibility of *P. gingivalis* clinical isolates, from chronic periodontitis (*P. chronic*) patients and periodontally healthy individuals to PMB and evaluate participation of lipid A 4' phosphatase in

resistance to PMB and hBDs-1 to -4. In addition, the role of other regions of LPS as OAg and/or APS in resistance to cationic peptides was evaluated using as a model the PMB.

Our results showed that isolates of *P. gingivalis* from P. chronic patients are more resistant to PMB respect from healthy individuals. Furthermore, healthy isolates are less resistant to PMB respect to the reference strain ATCC 33277. While, a mutant lacking phosphatase gene in the lipid A 4' position is totally susceptible to PMB, the presence of this gene in isolates does not correlate with the differential resistant observed since all isolates had the gene. Moreover, the lipid A structural analysis of the isolates shown 4' phosphorylated structures in both, susceptible and resistant PMB isolates, suggesting that *P. gingivalis* lipid A composition is not the only determining factor in clinical isolates PMB resistance, and probably to other cationic peptides, since the mutant was able to grow even to highest hBDs-1 to -4 concentrations. In healthy subject isolates lacked high molecular weight OAg and APS molecules, suggesting that *P. gingivalis* in healthy individuals do not produce or lose A-LPS. Finally, P. chronic isolates lacked APS molecules, suggesting that OAg and APS molecules are relevant in *P. gingivalis* resistance to cationic peptides PMB and hBDs -1 to -4.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad periodontal: Periodontitis

Según la Organización Mundial de la Salud, la periodontitis tiene una prevalencia a nivel mundial de un 35-50% en adultos, mientras que en Chile puede llegar al 90% en adultos (Gamonal et al. 2010, Petersen et al. 2005). Es una enfermedad infecciosa crónica que involucra la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes, como son: el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento radicular, pudiendo eventualmente producir la pérdida de uno o más dientes afectados por la periodontitis (Clark and Loe 1993, Kinane and Lappin 2002, Smith et al. 2010).

La gingivitis, que precede a la periodontitis, se inicia cuando el surco gingivo dentario es invadido por diversas especies bacterianas, las que se adhieren a la superficie dentaria, siendo capaces de multiplicarse y generar un ecosistema favorable para su colonización y persistencia, originando una biopelícula de placa subgingival (entre el diente y la encía) (Clark and Loe 1993, Haffajee and Socransky 1994, Kesic et al. 2008, Slots 1979). Conforme la enfermedad periodontal progresa, se profundiza más la inserción de los tejidos de soporte con el diente, aumentando la pérdida de inserción y dando paso a la formación del saco periodontal, signo patognómico de la enfermedad. En los estados avanzados de la enfermedad finalmente se produce la pérdida de dientes (Kinane and Lappin 2002).

En la periodontitis, a medida que los surcos se profundizan la biopelícula subgingival cambia su composición y se favorece la colonización por especies mayoritariamente anaeróbicas y Gram negativo (Berezow et al. 2009, Dzink et al. 1988, Socransky and Haffajee 2002). Entre los patógenos periodontales que constituyen la biopelícula subgingival se encuentran: *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, destacando *P. gingivalis* como uno de los agentes etiológicos más estudiados en el inicio y progresión de la periodontitis (Byrne et al. 2009, Cugini et al. 2013, Hajishengallis and Lamont 2012, Lamont and Jenkinson 1998, Socransky et al. 1998).

1.2. Barrera epitelial oral

Debido a la continua exposición de la mucosa oral a la biopelícula de placa supra y posteriormente subgingival, el epitelio oral cumple un papel fundamental estableciendo y regulando un equilibrio entre salud y enfermedad (Pomahac et al. 1998, Presland and Dale 2000). En este sentido, el epitelio oral se comporta como una barrera mecánica de protección frente a infecciones bacterianas, además de mediar la respuesta inmune. La barrera mecánica del epitelio oral la conforman los queratinocitos que fortalecen su arquitectura, formando parte de la inmunidad innata, y respondiendo activa e interactivamente mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas, que alertan a otras células tanto de la respuesta innata como adquirida atrayendo a polimorfos nucleares neutrófilos (Nish and Medzhitov 2011, Pomahac et al. 1998, Presland and Dale 2000).

Además, los queratinocitos pueden responder a algunos factores de virulencia bacterianos produciendo péptidos antimicrobianos, entre los cuales destacan las beta defensinas humanas (hBDs) (Dale and Fredericks 2005, Niyonsaba and Ogawa 2005). Este rol de las defensinas en la inmunidad innata establece una relación con la inmunidad adaptativa atrayendo linfocitos T de memoria y células dendríticas, así como también incrementando la producción de anticuerpos (Yang et al. 2001).

1.3. Las beta defensinas humanas

Las defensinas son pequeños péptidos antimicrobianos que como se dijo previamente, desempeñan un importante rol en la inmunidad innata humana ya que junto con su actividad antimicrobiana propiamente tal, poseen varias actividades biológicas, entre ellas la quimiotaxis selectiva de las células de defensa del hospedero (células dendríticas inmaduras, mastocitos y linfocitos T) y con ello la inducción de una potente respuesta inflamatoria, como resultado de la degranulación de mastocitos y la quimiotaxis de neutrófilos (Niyonsaba et al. 2001, Yamashita and Saito 1989, Yang et al. 2000, Yang et al. 2004, Yang et al. 1999).

Estos péptidos pueden estar presentes en concentraciones micromolares (Gorr and Abdolhosseini 2011) y poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativo, Gram positivo, hongos e incluso algunos virus (Feng et al. 2006, Hazrati et al. 2006, Joly et al. 2004, Klotman and Chang 2006).

Las defensinas pueden ser divididas en las subfamilias α -y β -defensinas, la cuales difieren en la longitud y el plegamiento de las cadenas peptídicas, en la ubicación y posición de los residuos de cisteína y en los enlaces disulfuro, responsables de la vinculación de las cisteínas (Ganz 2003, Ganz and Lehrer 1995).

1.3.1. Las beta defensinas humanas en la cavidad oral

Las defensinas son pequeños péptidos antimicrobianos y dentro de la cavidad oral las hBDs son producidas por el epitelio gingival, la lengua, las glándulas salivales y otras regiones, lo que les permite situarse como la primera línea de defensa inmunológica en la cavidad oral (Abiko and Saitoh 2007, Bonass et al. 1999, Dale and Krisanaprakornkit 2001, Dale et al. 2001, Kohlgraf et al. 2010, Mathews et al. 1999, Pazgier et al. 2006, Tao et al. 2005).

En relación al importante rol que desempeñan estos péptidos en la mantención del equilibrio entre salud y enfermedad periodontal, varios investigadores han estudiado la expresión diferencial que las hBDs identificadas pudieran presentar en ambos estados, demostrando que prácticamente no existen diferencias significativas en la expresión de las hBDs-1, -2 y -3 en tejido gingival sano, mientras que en presencia de gingivitis conduce a un aumento en la expresión de hBD-2 (Krisanaprakornkit et al. 1998; Bissell et al. 2004; Lu et al. 2004; Dommisch et al. 2005). No obstante, en la periodontitis los niveles de la hBD-2 permanecen altos y además aumenta la expresión de hBD-3 (Abiko and Saitoh 2007, Abiko et al. 1999, Bissell et al. 2004, Dale and Fredericks 2005, Dommisch et al. 2005, Krisanaprakornkit et al. 1998, Lu et al. 2004, Lu et al. 2005, Vardar-Sengul et al. 2007).

Junto con relacionar los niveles de expresión de las defensinas con los estados de salud y la progresión de la enfermedad periodontal, otros autores han relacionado su expresión directamente con la composición microbiana de la biopelícula subgingival (Krisanaprakornkit et al. 1998, Krisanaprakornkit et al. 2000, Kurland et al. 2006, Taguchi and Imai 2006, Yin et al. 2010). Krisanaprakornkit et al. (2000) propusieron que la expresión basal de la hBD-2 en tejido sano está relacionada con la presencia de bacterias comensales no patógenas. Estos resultados indican la importancia de la hBD-2 en la respuesta inmune innata y en la mantención de un estado elevado de alerta frente a cambios en la microbiota normal del epitelio oral, como ocurre en la enfermedad

periodontal (Krisanaprakornkit et al. 2000). En el caso de las hBDs-3 y -4 su expresión en células epiteliales gingivales aumenta en respuesta a la estimulación por citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , esteroides de forbol y componentes de la pared celular bacteriana (García et al. 2001, Harder et al. 2001, Krisanaprakornkit et al. 2000, Mathews et al. 1999, Mineoka et al. 2008, Vankeerberghen et al. 2005). Así como también las defensinas aumentan en respuesta a bacterias patógenas, entre ellas *P. gingivalis*, que como ya se dijo es uno de los principales agentes etiológicos de la periodontitis (Krisanaprakornkit et al. 2000).

1.4. *P. gingivalis* y periodontitis

Aunque los factores que conducen al desarrollo de la enfermedad periodontal no están completamente dilucidados, un nuevo modelo de patogénesis periodontal propone que se inicia por una comunidad microbiana disbiótica y sinérgica, en el cual la influencia de especies microbianas dentro de un ecosistema conducen a un desbalance de dichas comunidades (Hajishengallis et al. 2012).

P. gingivalis es una bacteria anaerobia Gram negativo asacarolítica, reconocida como un patógeno “clave” en el inicio y progresión de la enfermedad periodontal y la más frecuentemente aislada en pacientes con periodontitis crónica (P. crónica). *P. gingivalis* es una de las bacterias más documentadas en causar disbiosis, un factor relevante en el potencial patogénico de toda la comunidad microbiana periodontal, así como también es capaz de invadir localmente los tejidos periodontales y de evadir los mecanismos de defensa del hospedero, como es el caso de las defensinas (Cugini et al. 2013, Hajishengallis et al. 2012).

1.5. *P. gingivalis* y las beta defensinas humanas en la cavidad oral

P. gingivalis es capaz de inducir la sobre-expresión de las hBDs-1, -2, y/o -3 en células epiteliales gingivales humanas (Krisanaprakornkit et al. 2000, Taguchi and Imai 2006, Vankeerberghen et al. 2005). Estos patrones de expresión son completamente diferentes de los producidos por microorganismos comensales del tracto gastrointestinal, como *Fusobacterium nucleatum* (comensal oral, no relacionado con la enfermedad periodontal) y *Escherichia coli* (*E. coli*, comensal intestinal), donde la única hBDs inducida es la hBD-2 (Krisanaprakornkit et al. 2000).

A partir de las diferencias en la expresión de las defensinas frente a patógenos periodontales algunos autores sugieren que la sobre-expresión de las hBDs podría incrementar los niveles locales de las defensinas y subsecuentemente su actividad (Dale and Fredericks 2005, Maisetta et al. 2005, Ouhara et al. 2005, Vankeerberghen et al. 2005), sin embargo, varias cepas de *P. gingivalis* (ATCC 33277, ATCC 49417, W83, W50) han mostrado ser poco susceptibles, o más bien resistentes, a los diversos péptidos antimicrobianos como a: K₄-S₄(1-15)a, dhvar4a, catelicidina LL-37 y hBDs-1 a -4 (Altman et al. 2006, Bachrach et al. 2008, Guthmiller et al. 2001, Ji et al. 2007, Joly et al. 2004, Maisetta et al. 2003, Ouhara et al. 2005). No obstante, hasta la fecha se desconocen los mecanismos que pudieran estar involucrados en su resistencia.

1.6. Factores de virulencia de *P. gingivalis* relacionados con la resistencia a péptidos catiónicos

Algunos mecanismos de sobrevivencia de *P. gingivalis* le confieren la capacidad de evadir la respuesta inmunológica del hospedero. Esta bacteria tiene la propiedad de adherirse a una variedad de superficies entre la cuales destacan los tejidos duros mineralizados del diente con superficies de la mucosa incluyendo las encías, las mejillas y la lengua (Lamont and Jenkinson 1998). Dada esta gran variedad de superficies disponibles para su adhesión, *P. gingivalis* ha evolucionado, incorporando un repertorio de factores de adaptación entre los cuales se encuentran diversas moléculas y estructuras de adhesión esenciales para interaccionar con el hospedero (Holt et al. 1999, Lamont and Jenkinson 1998, Pathirana et al. 2010).

En función de los mecanismos de adaptación incorporados en su evolución, *P. gingivalis* cuenta con importantes factores de virulencia como las adhesinas fimbriales o fimbrias, involucradas en la adherencia de la bacteria a una variedad de sustratos y moléculas orales (Dickinson et al. 1988, Hajishengallis et al. 2008, Holt et al. 1999, Kolenbrander and London 1993, Lamont and Jenkinson 1998, Njoroge et al. 1997, Yoshimura et al. 2009). Además, su metabolismo asacarolítico le confiere la capacidad de aprovechar al máximo los nutrientes del medio. Junto a estos factores, *P. gingivalis* destaca por su robusta actividad proteolítica, debido a la expresión de cisteína-proteasas extracelulares, conocidas como gingipaínas (Andrian et al. 2004, Genco et al. 1999, Houle et al. 2003, Lamont and Jenkinson 1998).

Las gingipaínas son capaces de unirse a la región C-terminal de argininas y lisinas altamente presentes en péptidos catiónicos, lo cual ha hecho suponer que la resistencia exhibida por *P. gingivalis* a estos péptidos está relacionada con su presencia. Si bien Carlisle et al. (2009) observaron que el sobrenadante de una cepa específica de *P. gingivalis* es capaz de degradar las hBDs-1, -2 y -3, no se sabe si la actividad antimicrobiana de dichos péptidos es alterada bajo estas condiciones, así como tampoco se sabe si el sobrenadante de otras cepas de *P. gingivalis* que contengan otras proteasas también son capaces de degradar las defensinas (Carlisle et al. 2009). Adicionalmente, los resultados obtenidos con los péptidos K₄-S₄(1-15)a, dhvar4a y catelicidina LL-37 indican que el mecanismo de resistencia de *P. gingivalis* frente a estos, y muy probablemente frente a otros péptidos antimicrobianos, es independiente de sus proteasas (Bachrach et al. 2008).

1.6.1. LPS de *P. gingivalis*

Otro factor de virulencia de *P. gingivalis* es el lipopolisacárido (LPS) (Holt et al. 1999, Lamont and Jenkinson 1998). El LPS es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativo, endotoxina responsable de las manifestaciones tóxicas e inductor de potentes efectos patofisiológicos en las infecciones por este tipo de bacteria (Nair et al. 1983). Este componente es reconocido por el hospedero como una molécula foránea que estimula una respuesta inmune capaz de eliminar a la bacteria (Pulendran et al. 2001). El LPS de *P. gingivalis*, considerado un importante componente patogénico en el inicio y desarrollo de la P. crónica, presenta una baja potencia endotóxica en comparación con la respuesta clásica que ejerce el LPS de otras bacterias Gram negativo, como *E. coli* (Bainbridge et al. 2002, Fujiwara et al. 1990, Jain and Darveau 2010, Nair et al. 1983).

El LPS está constituido por tres regiones estructurales: el lípido A, la región del core y el polisacárido o Antígeno O (AgO). El lípido A constituye el ancla hidrofóbica del LPS en la membrana externa y es responsable de la actividad tóxica de la molécula, por lo que se denomina endotoxina (Raetz and Whitfield 2002, Rietschel et al. 1994). Este componente está unido covalentemente a la región del core, un oligosacárido fosforilado constituido por heptosas (core interno) y hexosas (core externo). Finalmente, el core externo se une al AgO, que se proyecta hacia el exterior de la superficie bacteriana (Fujiwara et al. 1990). Se ha señalado que el core está en íntimo contacto con las

proteínas de la membrana externa y, junto con ellas, es responsable de la función de barrera hacia moléculas hidrofóbicas como antibióticos y detergentes (Nikaido 2003, Nikaido and Vaara 1985). Además, es esencial para la viabilidad de la bacteria (Nikaido and Vaara 1985, Paramonov N. A. et al. 2009, Parker et al. 1992, Rietschel et al. 1994) (Figura 1).

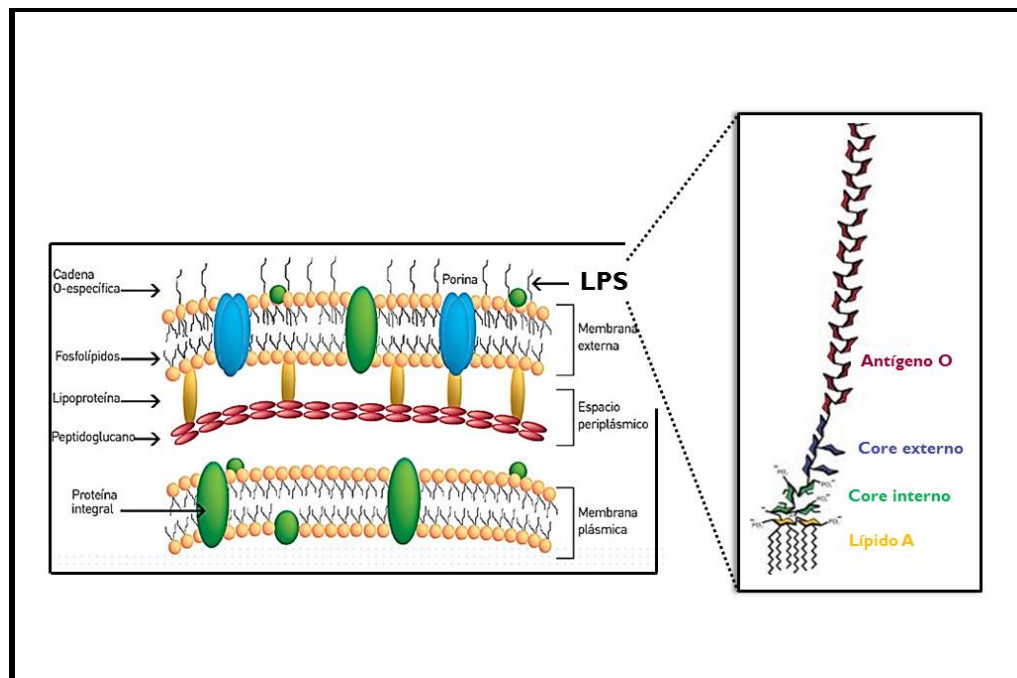


Figura 1: Composición estructural de la membrana de bacterias Gram negativo y del LPS (modificado de Bravo 2010).

Si bien el LPS suele ser muy conservado dentro de un género bacteriano, siendo el lípido A la porción más conservada de su estructura, en el caso de *P. gingivalis* se presenta una notable heterogeneidad estructural que se presume le confiere ventajas para su sobrevivencia (Bainbridge et al. 2002, Fujiwara et al. 1990, Kumada et al. 1995, Mansheim et al. 1978, Ogawa et al. 2007, Pulendran et al. 2001).

P. gingivalis, sintetiza dos tipos de LPS: i) el O-LPS que posee AgO (conteniendo unidades repetidas del tetrasacárido Glc-Rha-GalNAc-Gal) y ii) el A-LPS que presenta un polisacárido aniónico (APS, formado por mananos fosforilados) que en *P. gingivalis* W50 presenta una reducida actividad proinflamatoria comparado con el LPS completo conteniendo O-LPS y A-LPS (Paramonov et al. 2015, Paramonov et al. 2001, Paramonov N. et al. 2005, Paramonov et al. 2009, Rangarajan et al. 2008).

Al igual que otras bacterias Gram negativo, *P. gingivalis* inicialmente sintetiza un lípido A que contiene dos grupos fosfato en las posiciones 1 y 4' de la diglucosamina (Ogawa 1993, Ogawa and Yagi 2010) (**Figura 2**, m/z 1768). No obstante la bacteria cuenta con fosfatasa endógenas para esas posiciones que modifican el LPS dando lugar un lípido A de-fosforilado e inmunológicamente silente (Darveau et al. 2004, Herath et al. 2011, Ogawa et al. 2007, Reife et al. 2006).

Dependiendo de las condiciones de crecimiento como la temperatura y las concentraciones de hemina, un nutriente importante para el crecimiento de la bacteria y que está presente en la cavidad oral, *P. gingivalis* produce un lípido A con diferentes grados de fosforilación y de acilación (Al-Qutub et al. 2006, Curtis et al. 2011, Olczak et al. 2005) (**Figura 2**). Dichas modificaciones alteran su habilidad para activar los receptores tipo Toll-4, esenciales en la respuesta inmune innata del hospedero frente a patógenos Gram negativo (Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Curtis et al. 2011, Darveau et al. 2004, Herath et al. 2011, Olczak et al. 2005, Reife et al. 2006).

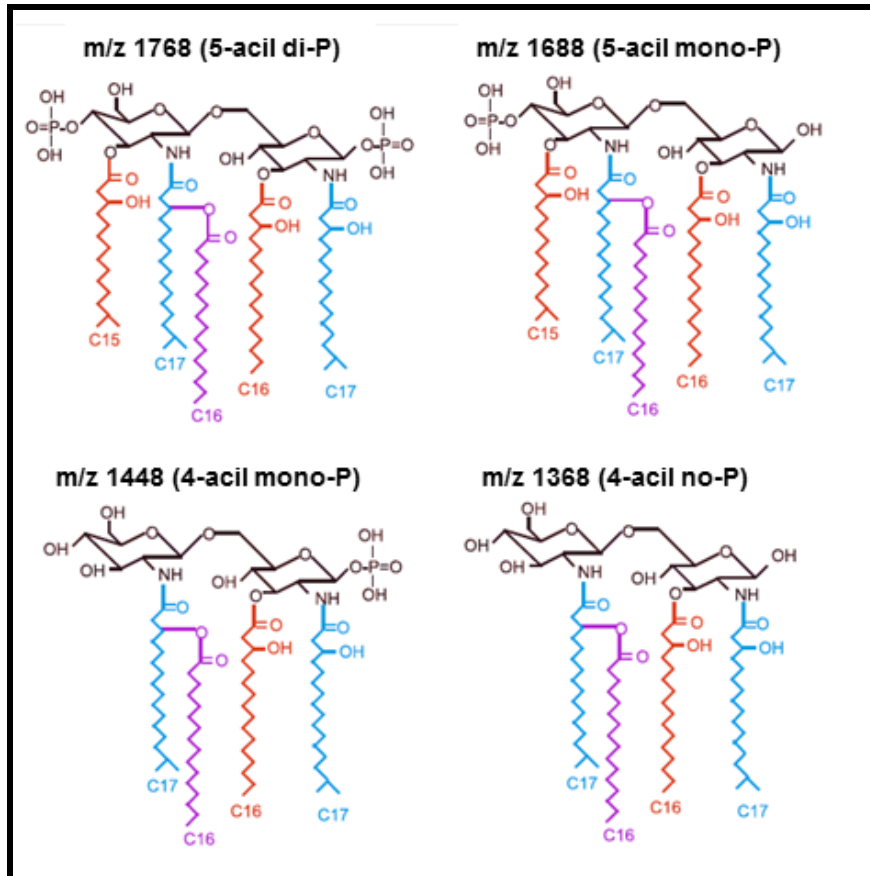


Figura 2. Estructuras del lípido A del LPS de *P. gingivalis* (Jain and Darveau 2010). En esta figura es posible observar la heterogeneidad estructural del lípido A de *P. gingivalis*. La estructura m/z 1768 del lípido A pierde sus fosforilaciones y/o acilaciones para dar las estructuras m/z 1688, m/z 1448 y m/z 1368.

1.6.1.1. LPS de *P. gingivalis* y las beta defensinas humanas

Junto con la estimulación diferencial de receptores que presenta el LPS de *P. gingivalis*, modificaciones estructurales en el lípido A han mostrado estar directamente relacionadas con su resistencia a concentraciones relativamente altas (200 $\mu\text{g/mL}$) de Polimixina B (PMB), un péptido catiónico de origen sintético ampliamente utilizado como modelo de la actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos endógenos, como es el caso de hBDs (Coats et al. 2009a).

El mecanismo de acción antimicrobiano ejercido por los péptidos catiónico (PMB y hBDs), consiste en la permeabilización de las membranas blanco a través de la formación de un poro estable y la interacción con macromoléculas periplásmicas y citoplasmáticas que conducen a la inhibición de la síntesis de ARN, ADN y proteínas (Cudic and Otvos 2002, Ganz 2003, Koprivnjak and Peschel 2011, Sahl et al. 2005). Este mecanismo se

inicia cuando los péptidos (cargas positivas) interactúan electrostáticamente con el LPS (carga negativa) de bacterias Gram negativo (Cudic and Otvos 2002, Koprivnjak and Peschel 2011).

Por lo anterior, se puede suponer que modificaciones en las estructuras superficiales de la membrana pueden participar de la resistencia de *P. gingivalis* a las hBDs. Una de estas estructuras puede ser el LPS, ya que las cargas negativas de esta molécula están relacionadas con la estabilización de la interacción electrostática del péptido con la bacteria (Nikaido 2003). En efecto, una cepa mutante carente del gen *PGN_0524* (que codifica para la fosfatasa 4' del lípido A) carece de lípido A de-fosforilado (**Figura 2**, m/z 1688), lo que incrementa el potencial de cargas negativas de la membrana externa de *P. gingivalis* y altera la interacción electrostática con PMB (Coats et al 2009). De esta manera modificaciones en el grado de fosforilación del lípido A le confieren a la bacteria diferencias en el grado de susceptibilidad al antimicrobiano PMB, sin embargo se desconoce si también inciden en la susceptibilidad a otros péptidos antimicrobianos, como las hBDs, así como tampoco se conoce el papel que pudieran tener otras regiones del LPS (AgO y APS) en la interacción de los péptidos con la bacteria.

1.7. Resumen de los antecedentes:

- La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria crónica que puede conducir a la pérdida de dientes y *P. gingivalis* es considerado un patógeno “clave” en el inicio y progresión de esta enfermedad.
- La barrera epitelial oral mantiene un equilibrio entre la salud y enfermedad a través de la producción de péptidos catiónicos antimicrobianos capaces de modular la respuesta inmunológica, entre ellos las hBDs.
- *P. gingivalis* cuenta con factores de virulencia que le permiten evadir la respuesta inmunológica (hBDs) y persistir en la cavidad oral, como es el caso del LPS.
- En el caso de *P. gingivalis* la composición estructural del LPS puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento y con ello puede presentar una potencia endotóxica inusual que le permite evadir los mecanismo de defensa del hospedero.
- Las modificaciones estructurales del lípido A se han relacionado con la resistencia al péptido catiónico modelo, PMB, sin embargo se desconoce si este

mecanismo está involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos fisiológicamente relevantes, como las hBDs.

- Una reducción en las cargas negativas de la membrana bacteriana, como el grado de fosforilación del lípido A, podría disminuir la interacción con péptidos catiónicos y resistir a su acción, sin embargo otras modificaciones estructurales del LPS, como las cargas negativas del AgO y APS, podrían estar involucradas en este mecanismo.

De acuerdo a los antecedentes descritos anteriormente, se propuso la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

“Modificaciones estructurales en el LPS de *P. gingivalis*, presentes en aislados de individuos periodontalmente sanos y de pacientes con periodontitis crónica, contribuyen en la actividad antimicrobiana a los péptidos catiónicos PMB y hBDs-1 a -4”.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la contribución de modificaciones estructurales en el LPS de aislados de *P. gingivalis*, obtenidos de individuos periodontalmente sanos y de pacientes con periodontitis crónica, en la resistencia a los péptidos catiónicos PMB y hBDs-1 a -4.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido catiónico PMB sobre aislados de *P. gingivalis* de individuos periodontalmente sanos y pacientes con periodontitis crónica.
2. Determinar el papel de la fosforilación en la posición 4' del lípido A del LPS en la resistencia de *P. gingivalis* a PMB y las hBDs-1 a -4.
3. Determinar el papel de otras regiones del LPS en la resistencia de los aislados de *P. gingivalis* a PMB y las hBDs-1 a -4.
 - 3.1. Analizar la región del AgO del LPS de los aislados clínicos de *P. gingivalis*.
 - 3.2. Analizar el polisacárido aniónico del LPS de la cepa de referencia y aislados clínicos de *P. gingivalis*.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas usadas durante el desarrollo de esta tesis están descritas en la **Tabla 2.1.1.**

Tabla 2.1.1. Cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Descripción	Origen
ATCC 33277	Cepa de referencia de <i>P. gingivalis</i> , disponible en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. <u>Características:</u> - No presenta cápsula o antígeno K - Presenta fimbria mayor (<i>fim A</i> tipo I)	Donada por el Dr. Joseph Aduse-Opoku, Centro de Inmunología y enfermedades infecciosas, Instituto Blizard, UK.
Δ PG1587	Cepa mutante de la ATCC 33277. <u>Características:</u> - Carece del gen que codifica para la fosfatasa 4' del lípido A (<i>PGN_0524</i>) - Delecionada en el gen, posee un cassette de resistencia a eritromicina (<i>Erm^R</i>)	Donada por el Dr. Stephen R. Coats, Departamento de Periodoncia, Escuela de Odontología de la Universidad de Washington, Seattle, Washington, USA.

2.1.2. Cultivos bacterianos

Los materiales y reactivos usados para cultivos bacterianos se encuentran en la **Tabla 2.1.2.**

Tabla 2.1.2. Lista de materiales y reactivos de cultivo bacterianos

Nombre	Abrev.	Descripción	Fabricante	No. Cat
Medio Agar base n° 2	-	Medio basal.	OXOID	PB0114
Agar agar	-	Medio basal.	OXOID	LP0011
Sangre de caballo desfibrinada	-	Suplemento para medio de cultivo.	ISP	-
Hemina	-	Suplemento para medio de cultivo.	CALBIOCHE M	3741
Menadiona	-	Suplemento para medio de	SIGMA	M5625

		cultivo.		
Infusión cerebro corazón	BHI	Medio basal	OXOID	-
Eritromicina	Erm		SIGMA	E5389-5g
Placas de cultivo	-	Material plástico de cultivo.	GREINER BIO ONE	NA
Placas de 96 pocillos	-	Material plástico de cultivo celular.		NA
Tubos de vidrio tapa rosca	-	Material de vidrio		NA
Jarra de anaerobiosis	-	Contenedor hermético	OXOID	NA
Anaerogen	-	Generadores de anaerobiosis, reductores.	OXOID	-

2.1.3. Reactivos Generales

Los reactivos de uso general se encuentran detallados en la **Tabla 2.1.3.**

Tabla 2.1.3. Lista de reactivos de uso general.

Nombre	Abrev.	Descripción	Fabricante	No. Cat
Conos de papel n° 30	-		MAIFILLER	NA
Filtros 0,22 µm	-		-	NA
Papel filtro 0,45 µm	-		-	NA
1,4-Ditiotreitol	DTT		SIGMA	-
Resazurina	-		SIGMA	-
Fosfato dipotásico	K ₂ HPO ₄		WINKLER	
Cloruro de sodio	NaCl		MERCK	-
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄		WINKLER	-
Sulfato de magnesio	MgSO ₄		MERCK	-
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄		MERCK	-
Nitrato de plata	AgNO ₃		WINKLER	PI-1170
Beta defensina humana-1	hBD-1		LUISVILLE KY	
Beta defensina humana-2	hBD-2		LUISVILLE KY	
Beta defensina humana-3	hBD-3		LUISVILLE KY	
Beta defensina humana-1	hBD-4		LUISVILLE KY	
Polimixina B	PMB		SIGMA	P1004-5mg
Proteinasa K	-		SIGMA	P8811-100mg
Peryodato de sodio	NaIO ₄		MERCK	

2.1.4. Anticuerpos

Los anticuerpos usados para Western Blot están descritos en la **Tabla 2.1.4**.

Tabla 2.1.4: Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Blanco	Isotipo	Dilución	Fabricante	No. Cat
Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot					
MAb (1B5)	Humano/ratón /rata	Rat Monoclonal	1:20	Donado por los Drs. Michael A. Curtis y Joseph Aduse-Opoku	NA
Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot					
Anti mouse HRPO	-	Goat	1:500	PIERCE	R-21455

2.1.5. Reactivos utilizados para biología molecular

Los reactivos y partidores utilizados en biología molecular se encuentran descritos en la **Tablas 2.1.5 y 2.1.6**, respectivamente.

Tabla 2.1.5: Lista de reactivos para biología molecular

Nombre	Descripción	Fabricante	No. Cat.
FAVORGEN ARNr 16S	Kit de extracción de ADN bacteriano	FAVORGEN	FABGK00 1-1
Taq Pol	Taq polimeras 0,5 U/μl	INVITROGEN	Bio-21042
MgCl ₂	Cloruro de magnesio 50 mM	INVITROGEN	Mg-110c
Amortiguador Tris pH 8 10X	Amortiguador Tris pH 8,0	INVITROGEN	Nh-110i
dNTPs	Nucleótidos fosfatados	INVITROGEN	D(A,G,T,C)-109L
GeneRuler 100pb plus DNA Ladder	Estándar de peso molecular 100bp plus	THERMO FISHER	SM0321
Agarosa		BIOLINE	Bio-41025
Gel red		BIOTIUM	41002

Tabla 2.1.6: Lista de partidores utilizados para la identificación y gen de la fosfatasa en 4' (PGN_0524) de *P. gingivalis*

Secuencia	Partidor sentido 5'-3'	Partidor antisentido 5'-3'	Amplicón (pb)
Región ARNr 16S de <i>P. gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404
PGN_0524	CGT GCG TGT TAG AAT TAC AG	CGG ATG CCA AGA TCA TTA TTA	992

2.1.6. Reactivos utilizados en el análisis del lipopolisacárido

Los reactivos utilizados en el análisis del lipopolisacárido se encuentran descritos en la **Tabla 2.1.7.**

Tabla 2.1.7: Lista de reactivos para el análisis del LPS

Nombre	Abrev.	Descripción	Fabricante	No. Cat
Dodecil sulfato de sodio	SDS		WINKLER	-
Beta mercapto etanol	-		MARCA	-
Trisma	-		WINKLER	-
Proteinasa K	-		SIGMA	P8811-100mg
Fenol saturado básico	-		WINKLER	-
Eter saturado	-		MERCK	-
Ácido clorhídrico	HCl		SUDENLAB	-
Ácido etildiaminotetraacético	EDTA		MERCK	-
2-ceto-3-deoxioctonato	KDO	Donación		NA
Purpald	-	Donación		NA
Ácido peryódico	NaIO ₄	Donación		NA
Hidróxido de sodio	NaOH		WINKLER	-
2-Propanol	-		WINKLER	-
Acrilamida	A		WINKLER	-
Bisacrilamida	BA		WINKLER	-
Glicerol	-		WINKLER	-
Tetrametiletilendiamina	TEMED		WINKLER	Bm-1970
Persulfato de amonio	APS		WINKLER	-
Tricina	-		US BIOLOGICAL	-
Etanol	EtOH		MERCK	-
Ácido acético	-		MERCK	-
Nitrato de plata	AgNO ₃		WINKLER	PI-1170
Amoniaco	-		WINKLER	-
Ácido cítrico monohidratado	-		WINKLER	-
Formaldehído	-		MERCK	-

Glicina	-		WINKLER	-
Metanol	-		WINKLER	-
Solución de amortiguador fosfato	PBS		-	-
Albúmina de suero bovino	BSA		SIGMA	-
Super signal West Pico	-	Sustrato quimioluminiscente	BIORAD	
TRIzol	-		LIFE TECHNOLOGIES	15596018
Cloroformo	CHCl ₃		MERCK	
Ácido acético glacial	-		MERCK	
Kit BCA	-	Kit para cuantificación de proteínas	PIERCE	
5-cloro-2-mercaptobenzotiazol	CMBT		SIGMA	
Hexano	-			
Membrana de nitrocelulosa	-		BIORAD	

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de los aislados clínicos de *P. gingivalis*.

a) Selección de los pacientes.

Los individuos incluidos en este estudio se reclutaron en la clínica odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El protocolo se les explicó claramente a todos los individuos incluidos en el estudio, los cuales debieron firmar un Consentimiento Informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

A partir de los individuos reclutados se seleccionaron 16 pacientes con P. crónica, con extensión de moderada a severa, y 11 individuos sanos clínicamente diagnosticados según los criterios internacionales establecidos (Armitage 1999). El diagnóstico se realizó de acuerdo a los parámetros clínicos de profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínica (NIC), medidas dicotómicas de acumulación de placa y sangramiento al sondaje según criterios previamente establecidos (Ashimoto et al. 1996). Para las mediciones

clínicas, en los individuos reclutados se examinaron 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual).

En una sesión posterior a las mediciones clínicas, se procedió a la toma de muestra de biopelícula subgingival. Los criterios de inclusión y exclusión de los individuos se determinaron de acuerdo a los criterios presentados en la **Tabla 2.2.1**.

Tabla 2.2.1. Criterios para la inclusión o exclusión de individuos sanos y pacientes con P. crónica.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
<p><u>INDIVIDUOS SANOS:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Ser > 18 años. ✓ Sitios con profundidad al sondaje < 3 mm <p><u>PACIENTES P. CRÓNICA:</u></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 \geq 5 mm y pérdida del nivel de inserción clínica \geq 3 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.

b) Toma de muestra.

Una vez realizadas las mediciones para cada paciente y control, se procedió a la toma de muestra microbiológica de placa subgingival. En el caso de los pacientes con P. crónica se tomaron muestras de los 4 sitios periodontalmente afectados que presentaron una mayor profundidad de sondaje ($PS \geq 5$ mm) y un nivel de inserción clínica ≥ 3 mm. Dada la menor frecuencia de detección de *P. gingivalis* en individuos sanos comparado con enfermos se aumentó a 8 el número de sitios muestreados (Mombelli et al. 1991a, b). Tanto para individuos sanos, como para pacientes con P. crónica se utilizaron 2 conos de papel estériles por sitio (nº 30 Maillefer®), es decir 8 conos en pacientes con P. crónica y 16 en individuos sanos. Los conos insertados fueron dejados durante 20 s en el sitio y

posteriormente se depositaron en viales con 2,0 mL de RTF (fluido de transporte reducido). Finalmente, las muestras en RTF se transportaron en frío (4°C) al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para su procesamiento dentro de las primeras 2 h.

c) Cultivo de anaerobios e identificación de *P. gingivalis*.

Las muestras obtenidas de pacientes con P. crónica y de individuos sanos se cultivaron en agar sangre hemina-menadiona (5 µg/mL) en jarra de anaerobiosis a 37°C durante 14 días. Una vez transcurrido este período se analizaron bajo una lupa estereoscópica (Stemi 2000 C, Zeiss), identificando colonias pigmentadas de negro y de las cuales se seleccionaron entre 8 y 16 colonias por muestra para su aislamiento y posterior identificación. Las colonias seleccionadas fueron resembradas en el mismo medio y cultivadas en iguales condiciones durante 7 días. Una vez obtenidas las colonias aisladas se tomó una muestra de cada una de ellas y se resuspendieron en tubos con metanol para visualizarlas bajo la luz UV (longitud de onda de excitación a 360 nm), detectando la presencia o ausencia de fluorescencia. Este método de fluorescencia en metanol permite diferenciar rápidamente entre los géneros *Prevotella* con fluorescencia positiva (color rojo) y *Porphyromonas* con fluorescencia negativa en colonias pigmentadas de negro (Slots and Reynolds 1982).

Una vez establecida la presencia del género *Porphyromonas*, se determinó la presencia de la especie *gingivalis* en las muestras por PCR. Además, los productos de PCR se secuenciaron y se compararon con el fragmento de ARNr 16S correspondiente a *P. gingivalis*, utilizando la Base de Datos del Microbioma Oral Humano (Human Oral Microbiome Database, HOMD) (Chen et al. 2010).

2.2.2. Ensayos de biología molecular.

P. gingivalis se identificó a partir de ADN total de cada uno de los RTF de las muestras clínicas y posteriormente a partir del ADN total de las colonias pigmentadas de negro aisladas. En el caso de los RTF se obtuvo ADN por ebullición, y en el caso de las colonias aisladas mediante un kit de extracción de ADN (kit FAVORGEN®). Una vez aislado el ADN, se amplificó una región altamente conservada de 404 pb del gen que codifica para el ARNr 16S utilizando los partidores específicos descritos previamente (Ashimoto et al. 1996).

La reacción por PCR también se utilizó para la identificación del gen de la fosfatasa *PGN_0524* en todos los aislados de *P. gingivalis*, utilizando como control positivo la cepa ATCC 33277 y como negativo a la Δ PG1587. Para ello se diseñó un par de partidores específicos para las regiones río arriba y río abajo del gen *PGN_0524*, los cuales generan un amplicón de 992 pb.

La mezcla para cada reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L y consistió en 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1X de amortiguador Tris pH 8,0, 0,5 μ M de cada partidor, 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen® 5 U/ μ L), y 5 μ L del templado de ADN. Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador y fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento de los partidores a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 3 min; y extensión final a 72°C por 10 min.

Para la verificación de los amplicones esperados (404 y 992 pb) los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con gel red® bajo la luz UV utilizando un sistema de imagen digital (KODAK Gel Logic 112).

2.2.3. Ensayos de actividad antimicrobiana.

a) Cultivos bacterianos.

Las cepas de referencia (ATCC 33277 y Δ PG1587) y los aislados clínicos obtenidos de *P. crónica* e individuos sanos se cultivaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C en placas de agar (5% sangre de caballo desfibrinada) o caldo BHI, ambos suplementados con hemina-menadiona (5 μ g/mL). La cepa Δ PG1587 se cultivó en presencia de eritromicina (5 μ g/mL).

b) Ensayos de microdilución en placa.

Para determinar la sensibilidad de los aislados clínicos de *P. gingivalis* y/o cepas de referencia (ATCC 33277 y Δ PG1587) a PMB y la hBDs-1 a -4 se utilizó el método de microdilución en placa utilizando una modificación de los protocolos descritos por (Altman et al. 2006, Coats et al. 2009a). Para ello, inicialmente se realizaron curvas de crecimiento de cada uno de los aislados, la cepa de referencia de *P. gingivalis* (ATCC

33277) y Δ PG1587 en caldo BHI suplementado en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Una vez obtenidas las curvas de crecimiento, se procedió nuevamente a cultivarlos en caldo durante el tiempo necesario para que cada uno alcanzara la fase exponencial temprana. Cada cultivo se ajustó a una DO₅₅₀ de 0,125 y se dispusieron alícuotas en placas de 96 pocillos en presencia de PMB a concentraciones de 0 a 275 µg/mL o de las hBDs-1, -2, -3 o -4 a concentraciones de 0 a 20 µg/mL. Las placas se incubaron a 37°C en anaerobiosis durante 48 h y se midió la absorbancia a DO₅₆₂. Los experimentos con PMB se realizaron en tres ensayo independientes por triplicado, mientras que para las defensinas se ensayaron para cada concentración en duplicado.

Para PMB la concentración inhibitoria mínima (MIC) se definió como la concentración más baja del antimicrobiano capaz de inhibir visiblemente el crecimiento bacteriano y fue expresado como el porcentaje de crecimiento relativo.

El porcentaje de crecimiento relativo de los aislados, cepa de referencia y mutante se calculó dividiendo la absorbancia a DO₅₆₂ de los pocillos en presencia de antibiótico por la de los pocillos sin antibiótico.

$$\% \text{ de Crecimiento} = \frac{\text{DO}_{562} \text{ Cultivo con antibiótico}}{\text{DO}_{562} \text{ Cultivo sin antibiótico}} \times 100$$

La eficacia de PMB se definió en función de la actividad antimicrobiana para la cepa de referencia de *P. gingivalis* ATCC 33277 descrita por (Coats et al. 2009a) en donde, bajo las mismas condiciones de cultivo y con una CIM de 100 µg/mL de PMB, la cepa de referencia es definida como “resistente” al efecto antimicrobiano. Por lo tanto, aquellos aislados que presentaron una CIM \geq a los 100 µg/mL fueron considerados como “**resistentes**”, mientras que aquellos con una CIM $<$ a los 100 µg/mL fueron considerados como “**susceptibles**”.

Por su parte, la eficacia de las defensinas se definió en función de la disminución del porcentaje de crecimiento de las cepas ensayadas (ATCC 33277 y mutante) respecto del control sin defensina. Dado en número de ensayos, se comparó el promedio de los porcentajes de crecimiento de todas las concentraciones de defensina utilizadas para la ATCC *versus* la mutante.

c) Ensayos de difusión en agar.

Además se evaluó la sensibilidad de los aislados clínicos de *P. gingivalis* y/o cepas de referencia (ATCC 33277 y Δ PG1587) a través de ensayos de difusión radial en presencia de PMB. Para ello tanto los aislados como las cepas de referencia se crecieron hasta fase estacionaria en caldo BHI suplementado, más eritromicina (5 μ g/mL) en el caso de la mutante, y se ajustaron a una DO_{600} de 0,3. Una alícuota de estas se inoculó sobre placas de agar sangre hemina-menadiona y esparcidas en césped y sobre ellas se dispusieron discos de papel filtro de 0,6 mm embebidos con diferentes cantidades de PMB (2,50; 25,0; 125 y 250 μ g). Las placas se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C y luego de transcurridas 48 h se midieron los halos de inhibición en milímetros. Cada experimento se realizó en tres ensayos independientes en triplicado.

La actividad antimicrobiana de PMB se definió en función de la actividad de las cepas de referencia, aquellos aislados de *P. crónica* que presentaron un halo de inhibición igual o significativamente mayor al de la cepa mutante (descrita en la literatura como susceptible a PMB) fueron consideradas como “**resistentes**” para dicha cantidad utilizada de PMB, mientras que aquellos individuos sanos con un halo de inhibición significativamente mayor al de la ATCC 33277 (descrita en la literatura como resistente a PMB) fueron consideradas como “**susceptibles**” (Coats et al. 2009a).

2.2.4. Análisis del lipopolisacárido.

a) Obtención de muestras para analizar en geles de poliacrilamida.

La obtención del LPS se realizó como describió (Marolda et al. 2006). Las bacterias se cultivaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 48 h en BHI suplementado. Se midió la DO_{600} y se tomó un volumen equivalente a 1,5 mL de cultivo bacteriano ajustado a una DO_{600} de 2,0 y se centrifugó a 10.000 x *g* por 2 min. El sedimento obtenido se suspendió en 90 μ L de tampón de lisis (SDS 2% y β -mercaptoetanol 4% en Tris 0,5 M pH 6,8) y se hirvió durante 15 min. A cada lisado se agregó 10 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó a 60°C durante 1,5 h. Posteriormente, se agregaron 150 μ L de fenol saturado básico 90% a 70°C incubando a esta misma temperatura durante 15 min, para luego disponer en hielo durante 10 min, una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron por 10 min a 10.000 x *g* recuperando la fase

acuosa y tratándola con 500 μ L de éter saturado en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Finalmente, se centrifugaron a 10.000 x g por un min y se descartó la fase acuosa. Las muestras se conservaron a -20°C.

b) Ensayo de Purpald.

Para la cuantificación del LPS se utilizó el ensayo de Purpald, el cual se basa en la oxidación peryódica a temperatura ambiente de residuos de azúcares como el 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) y posterior cuantificación del producto formaldehído que reacciona con el reactivo de Purpald (Lee y Tsai, 1999). Para ello se dispusieron 50 μ L de cada muestra de LPS purificado en una dilución 1:5.000 por duplicado en placas de 96 pocillos y se adicionaron 50 μ L de ácido peryódico (NaIO_4) 32 mM y se incubó por 25 min, luego se agregaron 50 μ L de reactivo Purpald 136 mM en NaOH 2N, se incubó por 20 min y se adicionaron 50 μ L NaIO_4 64 mM e incubó por otros 20 min. La espuma se eliminó con 20 μ L de 2-propanol. La absorbancia de cada pocillo se midió a 550 nm en un lector de ELISA.

c) Electroforesis.

Se prepararon geles de poli(acrilamida) (14%) en una Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad), basado en la técnica descrita por (Lesse et al. 1990). El gel resolutivo se hizo mezclando 1.460 μ L de ABA (acrilamida/bisacrilamida) 49,5%T, 6%C (23,25 g acrilamida y 1,5 g bisacrilamida en 50 mL H_2O), 1.660 μ L de Tampón de Gel (Tris-HCl 3,0 M pH 8,45 y SDS 0,3%), 1.400 μ L de H_2O , 520 μ L de glicerol, 6 μ L de TEMED, y 50 μ L de persulfato de amonio 10%. Luego de cargar la mezcla del gel resolutivo, se cubrió la solución con 200 μ L de isopropanol. Una vez polimerizada la mezcla del gel resolutivo, se retiró el isopropanol y se cargó la mezcla del gel concentrador. El gel concentrador (4%) fue preparado de la siguiente forma: 250 μ L de ABA 49,5%T, 3%C (4,8 g acrilamida y 0,15 g bisacrilamida en 10 mL H_2O), 775 μ L de Tampón de Gel, 2.000 μ L de H_2O , 6 μ L de TEMED, y 60 μ L persulfato de amonio 10%.

La cámara de electroforesis se llenó con solución anódica (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9) y catódica (Tris-HCl 0,1 M, tricina 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25). En los geles se cargaron cantidades iguales del LPS de cada muestra (determinado mediante el ensayo de Purpald o según visualización) y la electroforesis se realizó a 50 V durante 50 min y a 150 V durante 90 min.

d) Detección del lipopolisacárido mediante tinción con plata.

La tinción de LPS se realizó según modificaciones del método de (Tsai and Frasch 1982). El gel se fijó toda la noche en 200 mL de una solución 40% etanol absoluto y 5% ácido acético glacial. Se oxidó con agitación durante 10 min con 200 mL de una solución 40% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial y 0,7% ácido periódico o peryodato de sodio (NaIO_4). Se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 mL de H_2O . Se tiñó durante 15 min con 150 mL de una solución que contenía 1 g de nitrato de plata (AgNO_3), 2,8 mL de NaOH 1 M y 1 mL de amoníaco 25%. Nuevamente se lavó tres veces durante 10 min con agitación en 200 mL de H_2O . Se reveló de 5 a 20 min (hasta coloración deseada) en 250 mL de una solución que contenía 12,5 mg de ácido cítrico monohidratado y 125 μL de formaldehído 37%. Finalmente, la reacción se detuvo con al menos tres lavados de 5 min con H_2O .

e) Análisis densitométrico.

El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa para imágenes UN-SCANT-IT (Silk Scientific) de acuerdo al protocolo descrito por (Bravo et al. 2011). Se calculó la intensidad relativa entre la banda del lípido A-core y la intensidad de las bandas correspondiente al AgO , midiendo los pixeles de una ventana pequeña ubicada al centro de cada carril.

f) Detección del A-LPS mediante Western Blot.

Se preparó y corrió un gel como se describe previamente en la sección 2.2.4.c, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa marca en una cámara de electroforesis Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó con tampón de transferencia (glicina 1,44%, Tris 0,3 %, y metanol 20% agregado sólo al momento de usar) por 70 min a 250 mA. La membrana, luego de ser transferida, se lavó 3 veces con PBS por 5 min y se bloqueó con 5 mL de una solución de BSA al 5% en PBS y se agitó suavemente por 90 min a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$).

Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal MAb (1B5), el cual reacciona con el A-LPS (Curtis et al. 1999), diluido 1:20 en BSA-PBS a 4°C durante toda la noche. La incubación del segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a

peroxidasa de rábano, se realizó con una dilución 1:500 en PBS a temperatura ambiente por 2 h. La inmunodetección se realizó con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West-Pico en un scanner para quimioluminiscencia para Western Blot (C-DiGit™ Blot Scanner -LI-COR).

2.2.5. Análisis del lípido A.

a) Purificación del lípido A.

El lípido A se purificó por un método basado en el protocolo descrito por (Al-Qutub et al. 2006). Se creció un cultivo de 500 mL de la cepa de interés por 7 días en anaerobiosis, las bacterias se colectaron por centrifugación a 6.000 x g por 10 min y se liofilizaron en un liofilizador. Se obtuvo así, aproximadamente 1,5 g de masa seca.

A las bacterias liofilizadas se les adicionaron 7,5 mL de TRIzol y 2 mL de cloroformo, luego de mezclar bien e incubar durante 30 min a temperatura ambiente se centrifugó a 5.500 rpm por 20 min recuperando la fase acuosa en la parte superior de la suspensión, cuidando de no tomar nada de la interfase y repitiendo un lavado de la fase orgánica con 2 mL de H₂O para recuperar todo el LPS. Toda la fase acuosa recuperada conteniendo el LPS, azúcares y ácidos nucleicos fue liofilizada y tratada con 5 mL de una solución fría (-20°C) de MgCl₂ en etanol 0,375 M y centrifugada a 5.500 rpm por 5 min a 4°C para precipitar el LPS. El LPS precipitado se lavó con 5 mL de etanol 95% y centrifugó a 5.500 rpm por 5 min a 4°C, repitiendo 4 veces, luego se adicionaron 5 mL de etanol absoluto frío y se centrifugó a 5.500 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo el LPS se purificó removiendo los fosfolípidos y SDS adicionando reactivo de Folch (cloroformo-metanol 2:1) suficiente para generar una concentración 1% p/v y centrifugando a 10.000 rpm por 5 min a 4°C, repitiendo 4 veces. Posteriormente, el *pellet* obtenido se dejó secar bajo campana a temperatura ambiente, se confirmó la presencia del LPS purificado en un gel de poliacrilamida y se procedió a la purificación del lípido A.

Para la obtención del lípido A a partir del LPS purificado se realizó una hidrólisis ácida tratándolo con 500 µL de SDS 1% en acetato de sodio ajustado a pH 4.5 (pH crítico, ajustado con ácido acético glacial) y se incubó durante 1 h a 100°C para posteriormente congelar a -80°C y liofilizar. Finalmente, para la purificación del lípido A se adicionaron

1,25 mL de H₂O y 12,5 mL de etanol ácido (100 µL de HCl 4N en 20 mL EtOH 95%) y se centrifugó a 5.500 rpm por 5 min a 4°C, posteriormente el *pellet* de lípido se lavó 4 veces agregando 10 mL de etanol 95% frío y centrifugando a 5.500 rpm por 5 min a 4°C (Caroff, Tacken et al. 1988).

b) Determinación de proteínas.

La calidad del lípido A purificado se determinó disolviendo una parte del lípido A purificado en agua mili Q y midiendo concentración de proteínas con un kit BCA. El BCA es un método altamente sensible y selectivo que consiste en la reacción de las proteínas con Cu⁺² en un medio alcalino, con ello se reduce el cobre a Cu⁺¹, el que a su vez reacciona con BCA para dar un producto de color púrpura, soluble en agua y que absorbe a 562 nm.

c) Análisis por espectrometría de masa.

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron por medio de una colaboración con Dr. Frank C. Nichols del Departamento de Salud Oral y Ciencias del Diagnóstico, de la Escuela de Medicina Dental de la Universidad de Connecticut. Brevemente, los *pellets* de lípido A purificado se resuspendieron y se analizaron mediante infusión directa por medio de una bomba de jeringa a un espectrómetro de masas modelo QTrap 4000 (AB Sciex Pte. Ltd., CA-USA) equipado con una fuente de ionización Turbo V de tipo *electrospray* y un analizador de masas híbrido de triple cuadrupolo y trampa lineal de iones. Para la adquisición y el análisis de los datos espectrométricos se utilizó el programa Analyst (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies Instruments, Canadá). La adquisición de los espectros de masas (MS) y de fragmentación (MS²) se realizó en polaridad negativa.

Las purificaciones de lípido A se evaluaron a través de la determinación de la presencia de “low mass” fosfoetanolamina dihidroceramida (LM PE-DHC) (Nichols *et al.*, 2004; Nichols *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2012) y de los lipodipéptidos Lípido 654 y Lípido 430 (Clark *et al.*, 2013). Brevemente, las muestras resuspendidas se inyectaron a través de un HPLC Shimadzu al espectrómetro de masas QTrap 4000 y se utilizó una detección de tipo monitoreo de reacción múltiple (MRM) para una mayor sensibilidad y especificidad considerando los siguientes parámetros: para LM PE-DHC m/z 677→144, Lípido 654 m/z

653→381 y Lípido 430 m/z 430→141. Las adquisiciones se realizaron en polaridad negativa.

2.2.6. Análisis estadístico

Para analizar la distribución de los datos se utilizó el test de Shapiro Wilk. La comparación de las edades y parámetros clínicos de profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico se realizó con t de Student de dos colas para muestras desapareadas. La significancia estadística de los ensayos de microdilución en placa de PMB se analizó con el test estadístico “one way ANOVA” post-test “Dunnett” y post-test “Bonferroni” para los ensayos de difusión en agar de PMB utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0. Para los ensayos con hBDs-1 a -4, la significancia estadística se determinó mediante “ANOVA multifactorial” utilizando el software SPSS versión 20.00.

3. RESULTADOS

3.1. OBJETIVO 1: Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido catiónico PMB sobre aislados de *P. gingivalis* de individuos periodontalmente sanos y pacientes con periodontitis crónica.

3.1.1. Obtención de la muestra microbiológica a partir de biopelícula de placa subgingival de individuos sanos y de pacientes con periodontitis crónica moderada a severa.

De acuerdo a los resultados la profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico promedio para los 11 individuos sanos reclutados fue de 2,0 y 1,4 mm respectivamente. Dichos resultados difieren significativamente de los valores obtenidos en el caso de los 16 individuos enfermos, donde la profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico promedio es mucho mayor, con 3,2 y 3,9 mm respectivamente. De la misma forma el porcentaje de sitios con presencia de placa y de sitios que presentaron sangrado al sondaje fue significativamente mayor en individuos enfermos respecto de individuos sanos. Las características clínicas establecidas para cada uno de los grupos fueron coherentes con el cuadro clínico diagnosticado. Las características clínicas de para cada uno de los pacientes con P. crónica e individuos sanos reclutados se resumen en los anexos **(Tabla anexa 6.1)**.

Por otra parte sólo se trabajó con 4/16 pacientes con P. crónica y con 3/11 individuos sanos seleccionados por motivos analizados en la sección 1.1.2. De acuerdo a los resultados la profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico promedio para los 3 individuos sanos reclutados fue de 2,7 y 1,7 mm, respectivamente. Dichos resultados difieren significativamente de los valores obtenidos en el caso de individuos enfermos, donde la profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico promedio es mucho mayor, con 3,5 y 4,3 mm, respectivamente. De la misma forma el porcentaje de sitios que presentaron sangrado al sondaje fue significativamente mayor en individuos enfermos respecto de individuos sanos **(Tabla 3.1)**.

Tabla 3.1. Características clínicas de los pacientes con P. crónica e individuos sanos utilizados.

	P. CRÓNICA (N=3)	INDIVIDUOS SANOS (N=4)
EDAD (Prom ± DS)	40,8 ± 12,2	33,3 ± 11,4
PS (mm, Prom ± DS)	3,5 ± 0,7 [#]	2,7 ± 0,3 [#]
NIC (mm, Prom ± DS)	4,3 ± 0,8 [*]	1,7 ± 1,4 [*]
% de sitios con placa	67,4 ± 28,6	58,2 ± 22,6
% de sitios BOP	51,5 ± 22,2 [‡]	18,4 ± 65 [‡]

#Promedio de profundidad de sondaje (PS) de pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,0426$

*Promedio del nivel de inserción clínico de pacientes (NIC) con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,0286$

‡Porcentaje de sitios con sangrado al sondaje (BOP) en pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,0019$

3.1.2. Aislamiento e identificación de *P. gingivalis* a partir de las muestras microbiológicas obtenidas.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los 16 (100%) pacientes con P. crónica reclutados, se confirmó la presencia de *P. gingivalis* en 14 (88%) de ellos a partir de los RTF por PCR, siendo posible la obtención de aislados de *P. gingivalis* en 12 (75%) de ellos. Del total de dichos aislados sólo se trabajó con 4 (25%) de ellos, ya que el resto perdió viabilidad por manipulación.

En el caso de los 11 (100%) individuos sanos reclutados, se confirmó la presencia de *P. gingivalis* en 5 (46%) de ellos a partir de los RTF por PCR, se cultivó y fue posible aislar *P. gingivalis* en 4 (36%) de ellos. Del total de los aislados en este estudio se trabajó sólo con 3 (27%) de ellos, que fue el porcentaje de muestras que mantuvo su viabilidad luego de varios pasajes en el laboratorio. Por lo tanto, en el presente estudio se trabajó con un total de 4 aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de 4 individuos con P. crónica distintos y 3 aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de 3 individuos sanos distintos.

Además, nuestros resultados muestran que según la prueba en metanol en 15 (96%) de los pacientes con P. crónica reclutados y en 6 (55%) de los individuos sanos

está presente el género *Porphyromonas*. Los resultados de identificación fenotípica (fluorescencia en metanol) y molecular (PCR) obtenidos para cada individuo reclutado se encuentran en los anexos (**Tabla anexa 6.2**).

3.1.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de PMB sobre los aislados clínicos de *P. gingivalis* obtenidos.

Para determinar la sensibilidad de los aislados clínicos de *P. gingivalis* a PMB se realizaron ensayos de microdilución en placa. De acuerdo a los criterios definidos en la sección 2.2.3 b, en la **Figura 3** se observa que aislados provenientes de individuos sanos son significativamente más susceptibles a PMB en relación a la cepa de referencia ATCC 33277 a partir de los 10 µg/mL de PMB. Tanto para los aislados H2, como H3 la CIM aproximada estuvo alrededor de los 10 µg/mL. Si bien H1 presentó un porcentaje de crecimiento de aproximadamente un 17% a partir de los 20 µg/mL, dicho valor no difiere significativamente del de los otros aislados de individuos sanos. Por su parte, aislados de *P. crónica*, CP2, CP4 y CP3 poseen una mayor resistencia a PMB respecto de la ATCC 33277 a partir de los 20 y 30 µg/mL, respectivamente. Aunque CP1 es más susceptible a los 10 µg/mL de PMB respecto de la ATCC 33277, esta es capaz de mantenerse a concentraciones superiores a los 275 µg/mL. Más aún, todos los aislados de *P. crónica* presentan con una mayor resistencia a PMB respecto de la referencia (CIM aprox. 100 µg/mL), con una CIM superior a los 275 µg/mL. Por otra parte, la CIM de la cepa de referencia ATCC 33277 observada en este estudio coincide con la literatura (Coats et al. 2009a). La significancia estadística de los ensayos de microdilución en placa de PMB para cada aislado *versus* la cepa ATCC 33277 se encuentra en los anexos (**Tabla anexa 6.3**).

Lo anterior demuestra que PMB ejerce un efecto antimicrobiano diferencial sobre cada uno de los aislados y por tanto, los aislados presentan una “resistencia diferencial” al péptido catiónico PMB, en donde individuos sanos poseen una mayor susceptibilidad respecto de aquellos de *P. crónica* y de la cepa de referencia.

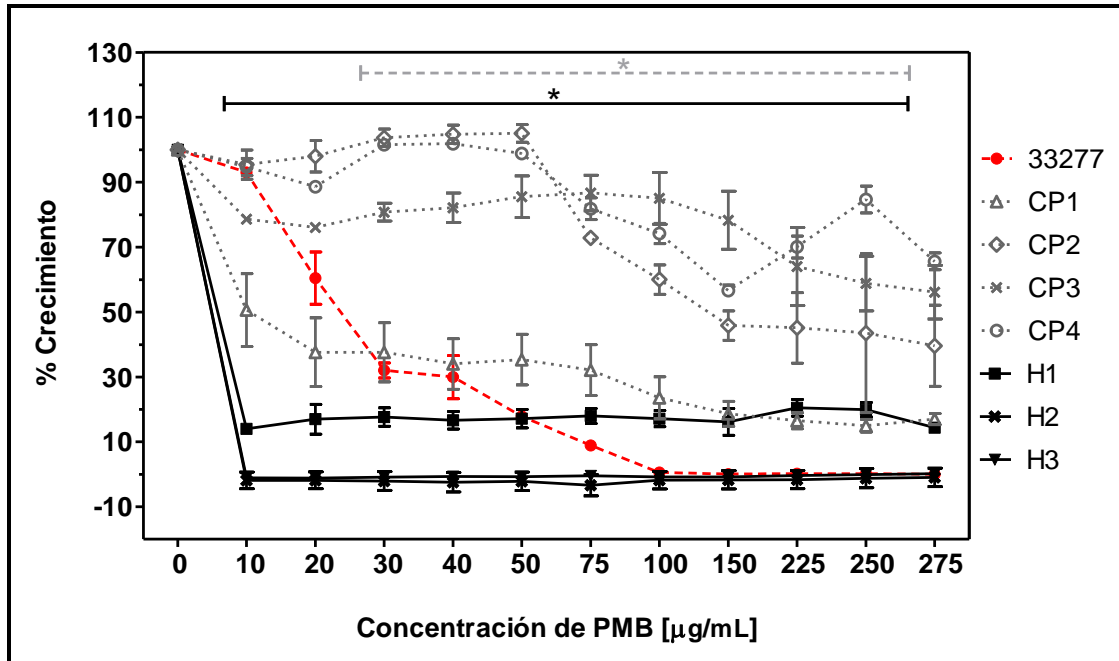


Figura 3. Ensayos de susceptibilidad de los aislados clínicos a Polimixina B. En la figura se muestra el porcentaje de crecimiento relativo de los aislados obtenidos de pacientes con P. crónica (CP1-4: línea gris punteada), de individuos sanos (H1-3: línea negra continua) y de la cepa de referencia (33277: línea roja continua) en presencia de concentraciones crecientes de PMB (0–275 µg/mL). El porcentaje de crecimiento se calculó dividiendo la absorbancia de los cultivos a DO_{562} en presencia de PMB por la absorbancia a DO_{562} de los cultivos sin el antibiótico. Los resultados mostrados corresponden al promedio de tres experimentos independientes en triplicado. Las diferencias significativas respecto a la cepa de referencia se indican con asteriscos negro o gris para aislados de individuos sanos y pacientes con P. crónica respectivamente. Las diferencias significativas corresponden a un $p < 0.05$ calculado utilizando test “two way ANOVA” y post-test “Bonferroni”.

3.2. OBJETIVO 2: Determinar el papel de la fosforilación en la posición 4' del lípido A del LPS en la resistencia de *P. gingivalis* a PMB y las hBDs-1 a -4.

3.2.1. Asociación de la presencia del gen que codifica para la fosfatasa 4' del lípido A, *PGN_0524*, con la resistencia de los aislados clínicos de *P. gingivalis* frente a PMB.

a) Resistencia diferencial de los aislados y ATCC 33277 versus la mutante Δ PG1587 frente a PMB.

Con la finalidad de relacionar la presencia del gen *PGN_0524* con la resistencia diferencial observada en los ensayos con PMB, se compararon las susceptibilidades de los aislados de individuos sanos y de pacientes con P. crónica, con la de la mutante Δ PG1587, a través de ensayos de difusión radial en presencia de PMB.

Los resultados muestran la cepa mutante fue susceptible incluso a los 2,5 μ g de PMB sugiriendo que la presencia del gen que codifica para la fosfatasa 4' del lípido A (o bien, la de-fosforilación en dicha posición) está involucrado en la resistencia de *P. gingivalis* a PMB. Por su parte, todos los aislados de pacientes con P. crónica difieren significativamente de lo observado con esta mutante a los 250 μ g y al igual que la cepa ATCC 33277 fueron resistentes hasta los 125 μ g del antimicrobiano. Finalmente, todos los aislados clínicos provenientes de individuos sanos fueron altamente susceptibles a PMB a partir de los 25 μ g (**Tabla 3.2**).

b) Evaluación de la presencia del gen *PGN_0524* en los aislados.

Ya que observamos que la susceptibilidad de los aislados de individuos sanos, a diferencia de los de aislados de P. crónica, es comparable a la de la cepa Δ PG1587 (entre 25 y 125 μ g), evaluamos la presencia del gen *PGN_0524* en todos los aislados clínicos, mediante PCR. Nuestros resultados muestran que todos los aislados clínicos de sanos y enfermos presentan el amplicón correspondiente a dicho gen (**Figura 4**).

Tabla 3.2. Susceptibilidad de los aislados clínicos, de pacientes con P. crónica e individuos sanos, cepa de referencia (ATCC 33277) y mutante (Δ PG1587) a PMB en ensayos de difusión radial (diámetro en mm \pm DS) en placas de agar sangre suplementadas con hemina-menadiona. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes en triplicado.

ORÍGEN	CEPAS Y AISLADOS	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm \pm DS)			
		PMB 2,50 μ g	PMB 25,0 μ g	PMB 125 μ g	PMB 250 μ g
Referencia y Mutante	33277	0	0	0	19 \pm 1,0
	Δ PG1587	11 \pm 0,7	26 \pm 3,5	35 \pm 0,0	> 35
P. crónica	CP1	0	0	0	22 \pm 2,1 [‡]
	CP2	0	0	0	18 \pm 1,5 [‡]
	CP3	0	0	0	20 \pm 4,0 [‡]
	CP4	0	0	0	16 \pm 1,0 [‡]
Individuos Sanos	H1	0	19 \pm 2,1 [#]	23 \pm 0,6 [#]	15 \pm 1,5 [*]
	H2	0	15 \pm 2,7 [#]	14 \pm 0,6 [#]	14 \pm 0,6 [#]
	H3	0	19 \pm 2,1 [#]	23 \pm 0,6 [#]	22 \pm 1,0 [#]

#Promedio del diámetro de los halos de inhibición de ATCC 33277 *versus* individuos sanos: $p < 0,001$

* Promedio del diámetro de los halos de inhibición de ATCC 33277 *versus* individuos sanos: $p < 0,01$

‡ Promedio del diámetro de los halos de inhibición de Δ PG1587 *versus* P. crónica: $p < 0,001$

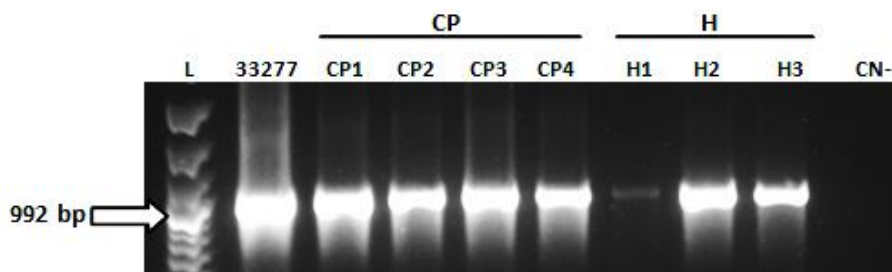


Figura 4. Identificación del gen codificante de la fosfatasa 4' del lípido A (*PGN_0524*). En la parte superior de los carriles se indica a que corresponden cada uno de ellos. L: estándar de peso molecular (ladder 100 pb plus); 33277: cepa de referencia ATCC 33277; CP: aislados de P. crónica; H: aislados de individuos sanos; CN-: control negativo. Al costado izquierdo se indica el tamaño de banda de la secuencia amplificada (992 pb).

3.2.2. Determinación de la presencia de la fosforilación en la posición 4' del lípido A de los aislados.

Con la finalidad de establecer si la presencia del gen de la fosfatasa, determinada en todos los aislados, se correlaciona con la ausencia del grupo fosfato en la posición 4'

del lípido A, se purificaron los lípidos A de los aislados de P. crónica e individuos sanos, y de las cepas ATCC y ΔPG1587 utilizando el protocolo descrito por (Al-Qutub et al. 2006).

Estructuralmente el lípido A está formado por un disacárido de glucosamina las que pueden presentar fosforilaciones y esterificaciones con diferentes ácidos grasos constituyendo una serie de diferentes especies. Para *P. gingivalis* se han descrito varias especies entre las que se encuentran la especie di-fosforilada (posiciones 1 y 4' de la diglucosamina) penta-acilada (fórmula, C₉₃H₁₇₈N₂O₂₄P₂) que en polaridad negativa presenta la señal m/z 1769 (forma [M-H]⁻) cuya estructura se esquematiza en la **Figura anexa 3** (Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006); la especie mono-fosforilada penta-acilada m/z 1688; las especies mono-fosforiladas tetra-aciladas m/z 1434 y m/z 1448; y la especie mono-fosforilada tri-acilada m/z 1193. Otras especies de lípido A y sus correspondientes señales m/z se detallan en los anexos (**Tabla anexa 6.4**).

A partir de los espectros de masas adquiridos en polaridad negativa para los diferentes aislados de pacientes con P. crónica, individuos sanos, cepa de referencia y mutante se examinó la presencia de las señales m/z descritas en la literatura las que se detallan en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Determinación de la presencia de especies de lípido A en aislados clínicos de pacientes con P. crónica (CP1-4) e individuos sanos (H1-3), cepa de referencia (ATCC 33277) y mutante (ΔPG1587). Para una presencia positiva se consideró aquellas señales con una intensidad (altura) de al menos una razón señal/ruido de 1,5 y conformar agrupaciones o clúster de señales que corresponde a la forma principalmente descrita para las diferentes especies de lípido A.

Muestra	Señal m/z lípido A									
	1157	1186	1193	1368	1434	1448	1475	1528	1688	1769
33277	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
CP1	✓	✓✓	x	x	✓	x	x	x	x	✓
CP2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓
CP3	✓✓	✓✓	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x
CP4	✓✓✓	✓✓✓	x	x	x	✓	✓	x	x	x
H1	✓✓✓	✓✓✓	x	x	x	✓	✓	✓	x	x
H2	✓✓	✓✓	x	x	✓	✓	✓	x	x	✓
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΔPG1587	✓✓	✓✓	x	x	x	x	✓	✓	x	✓

NOTA: ✓ Señal claramente visualizada en espectro de masa (el número refleja aproximadamente la intensidad); x Señal no detectada en espectro de masa; - Sin análisis de espectrometría de masa.

Para la cepa de referencia 33277 se observó una señal m/z 1448 de baja intensidad y no se estableció la presencia de otras especies de lípido A. Para el aislado CP2 se observó una señal m/z 1769 de baja intensidad y no presentó otras especies de lípido A. La ausencia de señales en estas muestras estaría asociada a una ausencia efectiva, como también sería causada por efecto de la supresión iónica debido a la presencia de contaminantes, o bien debido a la presencia de interferentes como otros lípidos y/o lípido A, efecto incrementado cuando se analizan muestras complejas mediante infusión directa como en este caso. Otros aislados como CP3, CP4, H1, H2 y Δ PG1587 sí presentaron algunas de las especies de lípido A descritas. Se observaron otras señales como m/z 1157, m/z 1186 y m/z 1475 que presentaron la formación de agrupaciones de señales en torno a ellas, sugiriendo la presencia de nuevas especies de lípido A. Aunque la ionización mediante *electrospray* es de tipo suave o blanda, esto es que, los compuestos al adquirir carga ya sea por protonación y/o formación de aductos con cationes en polaridad positiva o por desprotonación en polaridad negativa preservan su estructura intacta. Sin embargo, existe evidencia de desesterificación electrolítica durante el proceso de ionización que puede llevar a la formación de “nuevas” especies de lípido A como ocurriría con la señal m/z 1186 (Nichols et al. 2012). Por otra parte, las especies de lípido A tienden a formar agrupaciones de señales, como por ejemplo la m/z 1448 que no se observa como una sola señal sino rodeada por señales entre m/z 1420 y m/z 1476 separadas por 14 unidades (probablemente debido a diferencias en el largo de las cadenas de ácidos grasos) (**Figura 5**). Por estos resultados, especulativamente la señal m/z 1475 observada en los aislados estaría asociada a la especie m/z 1448 (Nichols et al. 2012). Por su parte, para el aislado H3 no fue factible el análisis.

Un punto a considerar es la precaución que se debe tener en la determinación de la presencia de especies en una muestra a través del análisis de espectros de masas ya que no es confirmativo en el caso de la utilización de espectrómetros de baja resolución como el utilizado. Es por lo anterior que se examinó el patrón de fragmentación (espectros MS^2) para algunas de las señales observadas, el cual resulta característico para un compuesto y por tanto constituye la base de la identificación.

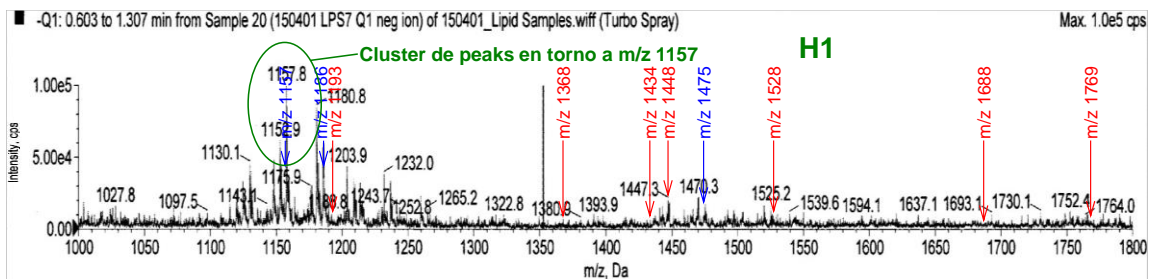


Figura 5. Espectro de masas (MS) representativo. En la figura se muestra un espectro de masas obtenido mediante infusión directa a un espectrómetro líquido de ionización por *electrospray* (QTrap 4000) para uno de los aislados de control sano (H1) en el cual se grafica la intensidad (cuentas por s o cps) de cada señal m/z (Da). El tiempo indicado de 0,603-1,307 min corresponde al tiempo seleccionado para generar el espectro de masas. En rojo se indican las señales descritas en literatura y en azul las observadas en esta tesis. El círculo en verde destaca la presencia de agrupaciones de señales m/z (cluster) en torno a m/z 1157.

En la **Figura 6** se muestran algunas fragmentaciones, para m/z 1769 se observaron diferencias de 270 y 242 unidades de masa que sugieren la pérdida de los ácidos grasos $iC_{17}-3OH$ y $iC_{15}-3OH$, respectivamente. Otros fragmentos se generarían por pérdidas combinadas como las diferencias de 336 y 337 unidades que corresponderían a la ruptura de C_{16} o $iC_{16}-3OH$ más de-fosforilación. Para las especies m/z 1157, m/z 1186 y m/z 1475 se desconoce su estructura, los patrones de fragmentación son insuficientes como para proponer estructuras pero se puede observar la pérdida repetitiva de 288-289 unidades de masa que corresponderían a la pérdida de ácidos grasos de masa 288-289 g/mol pero también podrían representar pérdidas estructurales combinadas como la pérdida de un ácido graso $iC_{17}-3OH$ (270 unidades de masa) y agua (18 unidades) u otra combinación (Coats et al. 2011, Coats et al. 2009b). Adicionalmente, la fragmentación de m/z 1157, m/z 1186 y m/z 1475 contiene algunas señales en común con la fragmentación de m/z 1769 tal como la señal m/z 265, también descrita en la literatura como parte de la fragmentación de la especie m/z 1688 (Coats et al. 2009b).

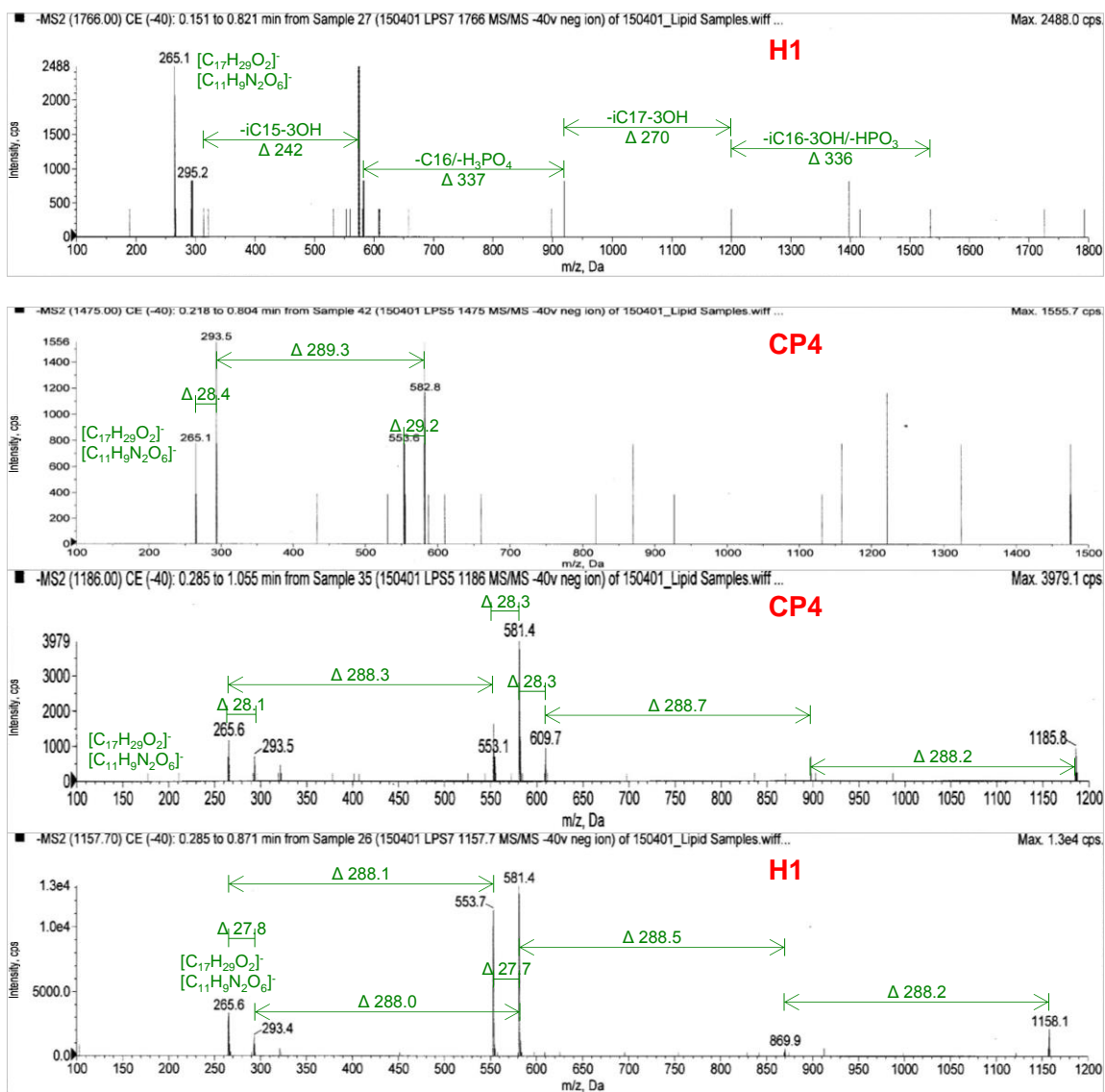


Figura 6. Espectros de fragmentación (MS²) representativos observados para las señales m/z 1766, 1475, 1186 y 1157. En la figura se indican algunas pérdidas estructurales propuestas que explicarían algunos de los fragmentos observados.

3.2.3. Evaluación del crecimiento relativo de la cepa de referencia ATCC 33277 y Δ PG1587 en presencia de las hBDs-1 a -4.

Ya que de manera similar a Δ PG1587, aislados de individuos sanos son susceptibles a PMB y aislados de P. crónica al igual que la ATCC 33277 son resistentes, evaluamos el efecto de los péptidos hBDs-1 a -4 sobre el crecimiento relativo de la cepa ATCC 33277 y mutante a través de ensayos de microdilución en placa. Lo anterior con la finalidad de determinar si el efecto antimicrobiano ejercido por PMB es comparable con el de otros péptidos catiónicos fisiológicamente relevantes.

El análisis estadístico realizado a los 64 resultados obtenidos indica que no existen diferencias significativas entre las cuatro defensinas ensayadas. Por otra parte, el porcentaje de crecimiento de la cepa ATCC 33277 difiere significativamente del obtenido con la cepa mutante, en donde las hBDs-1 y -2 tuvieron una mayor disminución en el porcentaje de crecimiento de la cepa ATCC y por el contrario, las hBDs-3 y -4 causaron una mayor disminución sobre la mutante. Además, es posible observar que la cepa mutante es capaz de crecer incluso a las concentraciones más altas de cada una de las defensinas (**Figura 7**). La significancia estadística de los ensayos de microdilución en placa para la cepa ATCC 33277 *versus* la mutante en presencia de las hBDS-1 a -4 se encuentra en los anexos (**Tabla anexa 6.5**).

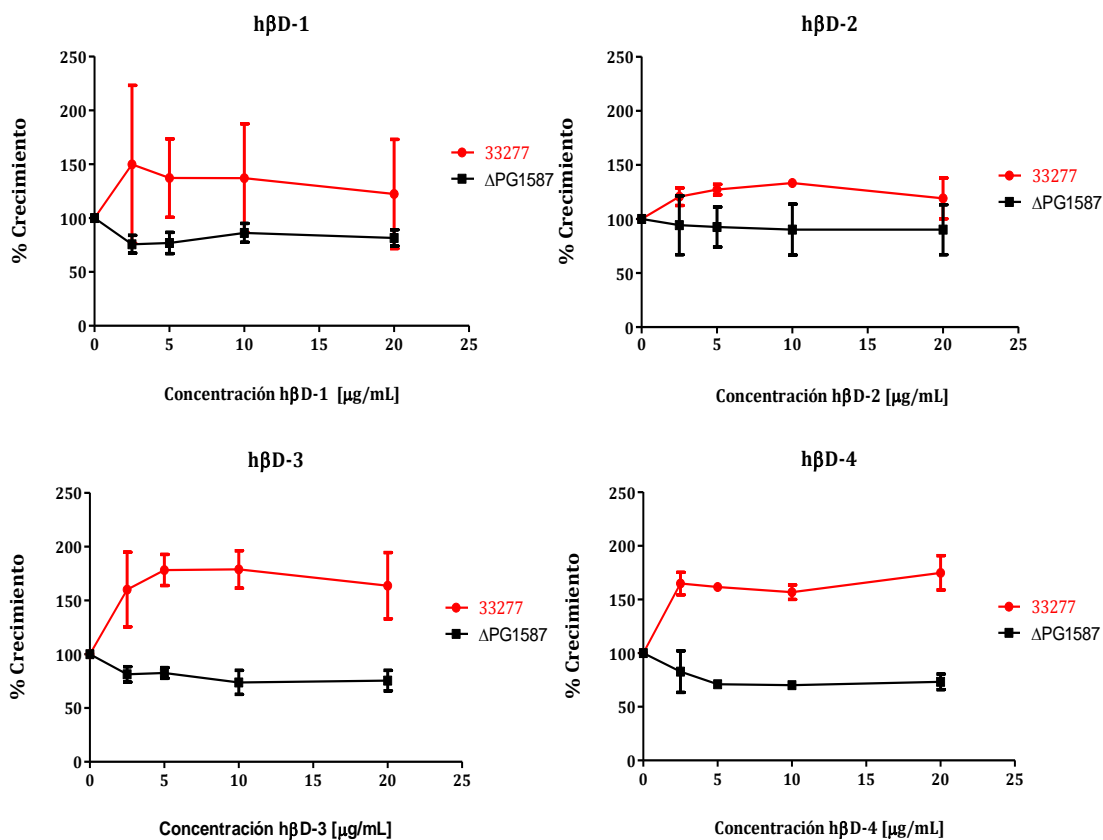


Figura 7. Crecimiento relativo de la cepa de referencia ATCC 33277 y ΔPG1587 *versus* concentraciones crecientes de las beta defensinas humanas (hBDs) -1, -2, -3 y -4. En la figura se muestra el porcentaje de crecimiento relativo de las cepas en presencia de concentraciones crecientes de hBDs-1 a -4 (0 – 20 μg/mL). El porcentaje de crecimiento se calculó dividiendo la absorbancia de los cultivos a DO₅₆₂ en presencia de cada defensina por la absorbancia a DO₅₆₂ de los cultivos sin defensina. Los resultados mostrados corresponden al promedio dos tres experimentos independientes en duplicado.

De acuerdo a los resultados experimentales en el desarrollo de este objetivo podemos afirmar que aislados de *P. crónica* e individuos sanos presentan resistencia diferencial en presencia de PMB. Si bien la mutante Δ PG1587 fue totalmente susceptible a todas las cantidades de PMB ensayadas, fue capaz de crecer incluso a las concentraciones más altas de las hBDs-1 a -4. Por otra parte, se confirmó la presencia del gen *PGN_0524* en aislados de sanos susceptibles y la estructura di-fosforilada (m/z 1766) estuvo presente indistintamente en los aislados de *P. crónica* resistentes.

Lo anterior nos permite suponer que si bien la fosfatasa 4', o la de-fosforilación en dicha posición, participa en la resistencia diferencial de los aislados de *P. gingivalis* a PMB, existen otros mecanismos involucrados los cuales pudieran estar relacionados con la resistencia de esta bacteria a las hBDs-1 a -4.

3.3. OBJETIVO 3: Determinar el papel de otras regiones del LPS en la resistencia de los aislados de *P. gingivalis* a PMB y las hBDs-1 a -4.

3.3.1. OBJETIVO 3.1: Analizar la región del AgO del LPS de los aislados clínicos de *P. gingivalis*.

Cambios en la composición del LPS pueden permitir la entrada de antibióticos como Novobiocina y, contrario a los aislados de *P. crónica*, los aislados de individuos sanos son resistentes a 2,5 μ g de este antimicrobiano (Bugueño 2014). Más aún, en una caracterización previa se determinó que entre ellos existen claras diferencias en la agregación y morfología colonial tanto en medio sólido como en caldo, las cuales han sido relacionadas con modificaciones en el LPS de *P. gingivalis* (Takada and Hirasawa 1998, Yamaguchi et al. 2010). En conjunto estos resultados sugieren que es probable que otras estructuras del LPS pudieran estar participando en la resistencia de la bacteria a los péptidos catiónicos hBDs.

Por lo anterior, nos propusimos estudiar el LPS purificado de los aislados a partir de los perfiles electroforéticos visualizados en geles de poliacrilamida al 14% (p/v) teñidos con plata (Tsai and Frasch 1982) y posterior densitometría (Bravo et al. 2011).

Todos los aislados de pacientes con *P. crónica* presentaron un LPS completo (lípidos A-core + PS polimérico) con una distribución de largos de cadena del AgO similar a

la cepa de referencia (comparar carriles 2 a 4 con carril 1, **Figura 8**), lo cual es confirmado con el análisis densitométrico de los carriles (**Figura 9A**). En particular, el aislado clínico CP1 presenta un perfil electroforético similar al de la cepa 33277, con una relación PS total/lípido A-core 2,88 *versus* 2,91 pixeles totales, respectivamente (**Figura 9A**). Tanto los aislados de *P. crónica* como la cepa 33277, poseen largos de cadena preferenciales superiores a las 8 unidades de PS (**Figura 8**). En el caso del aislado CP2 presenta una distribución de largos del AgO similar al de la 33277, CP3 y CP4 tienen una relación PS total/lípido A-core mayor comparado con la cepa 33277, 5,89 y 6,56 *versus* 2,91 pixeles totales respectivamente (**Figura 9A**). En tanto CP4, no polimeriza moléculas de alto peso molecular (**Figura 8**), similar a lo que ocurre en una distribución al azar (Martinic et al. 2011).

A diferencia de los aislados de *P. crónica*, todos los aislados de individuos sanos presentan un LPS rugoso, carente de moléculas de AgO de alto peso molecular (**Figura 8**, carriles 6-8, **Figura 9B**). Además, se observa que la región del lípido A-core tiene una menor movilidad electroforética comparado con la cepa de referencia (comparar puntas de flechas rojas en carriles 1, 6, 7 y 8, **Figura 8**). La ausencia del AgO en los aislados de sanos se confirmó cargando una cantidad 5 veces mayor de LPS (**Figura anexa 1**). Es importante mencionar que todos los aislados de un mismo paciente presentaron el mismo patrón electroforético de LPS (figura representativa, **Figura anexa 2**). Estos resultados ya fueron publicados (Díaz et al. 2015).

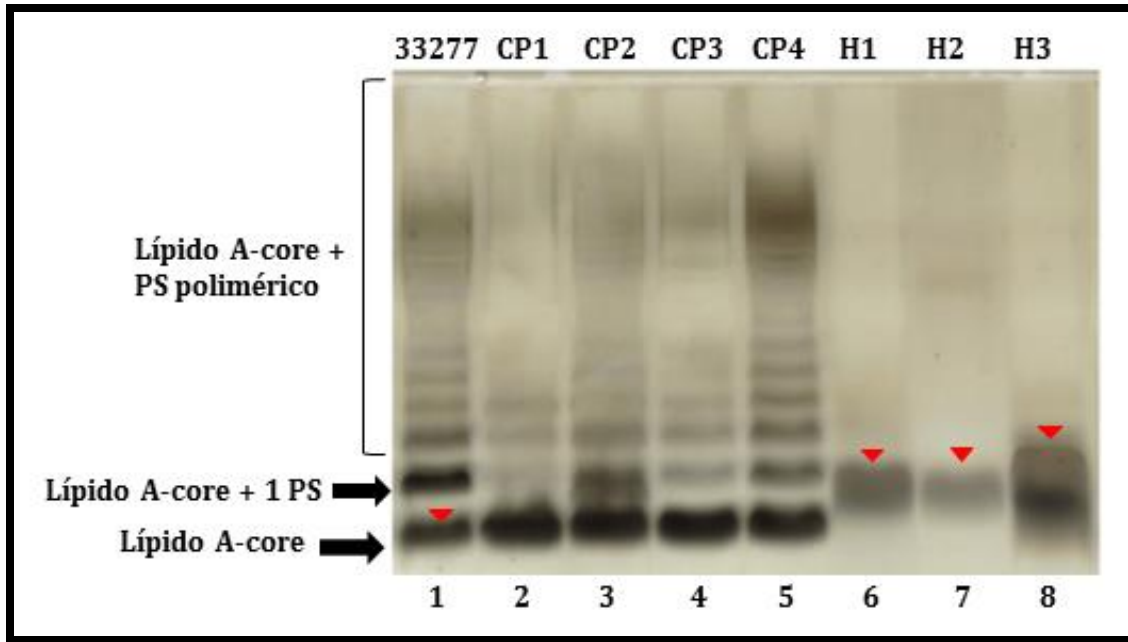


Figura 8. Perfiles de LPS de aislados clínicos de *P. gingivalis* de pacientes con P. crónica, de individuos sanos, y de la cepa de referencia. A) Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de Tricina-SDS-poliacrilamida seguido por la tinción con plata. La carga bacteriana fue estandarizada al inicio del protocolo de extracción (1×10^7 UFC). En la figura se muestran: carril 1: ATCC 33277, carril 2-5: aislados clínicos de pacientes con P. crónica (CP), carriles 6-8: aislados clínicos de individuos sanos (H). Las diferentes regiones del LPS se indican a la izquierda. La región del polisacárido (PS) comprende el AgO y el polisacárido aniónico (APS).

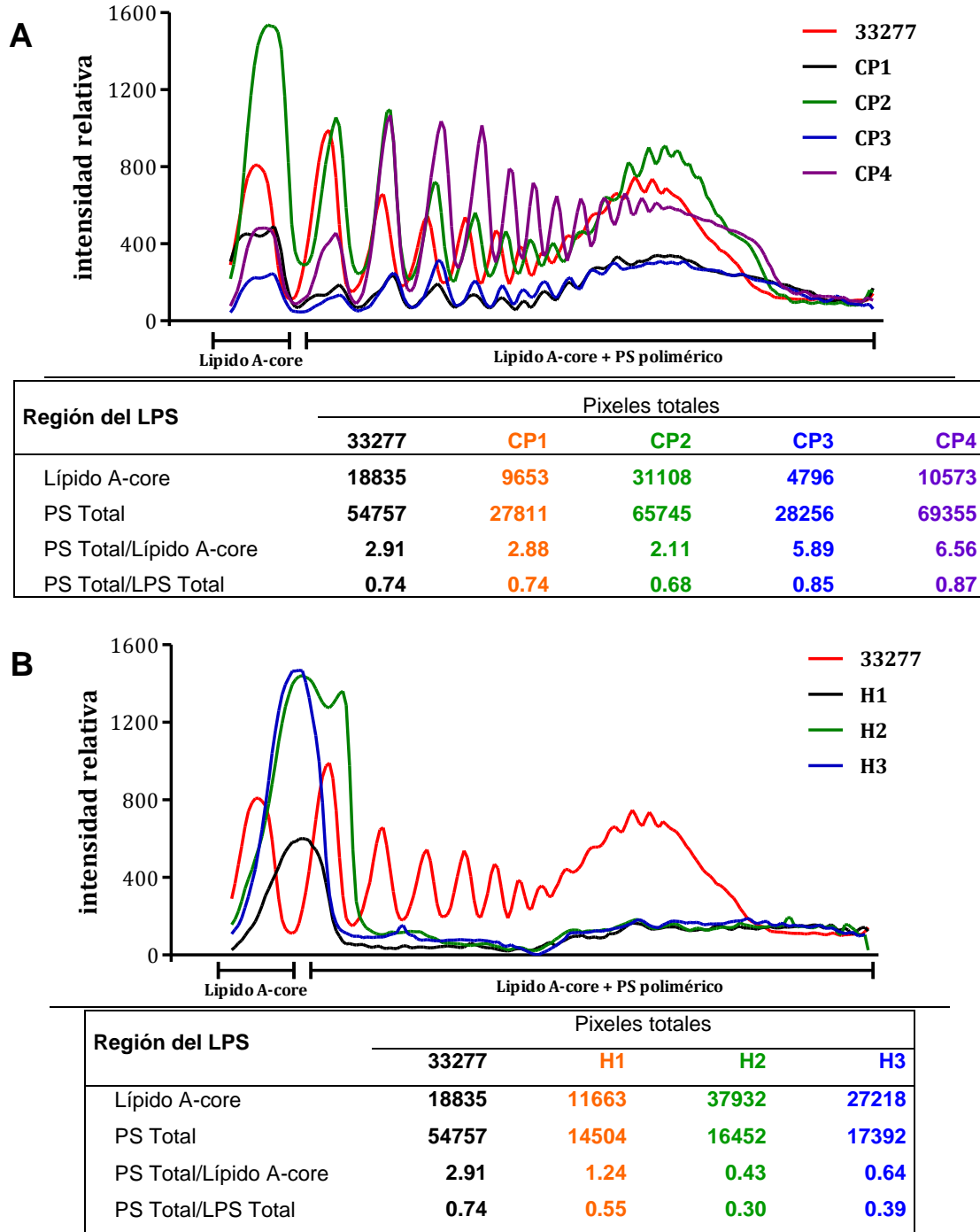


Figura 9. Análisis densitométrico del LPS de aislados clínicos de *P. gingivalis* de pacientes con P. crónica, de individuos sanos, y de la cepa de referencia. A) Análisis densitométrico del LPS de 33277 versus CP. B) Análisis densitométrico del LPS de 33277 versus H. El análisis densitométrico de los carriles del gel se realizó utilizando el software para gels UN-SCANT-IT (Silk Scientific). La intensidad relativa se calculó entre la banda del lípido A-core y la intensidad de las bandas correspondientes al PS, midiendo los píxeles de una ventana pequeña ubicada al centro de cada carril.

3.3.2. OBJETIVO 3.2: Analizar el polisacárido aniónico del LPS de la cepa de referencia y aislados clínicos de *P. gingivalis*.

Considerando que la presencia del APS, conteniendo unidades repetidas de mananos fosforilados, puede mejorar la interacción electrostática de la membrana bacteriana con péptidos catiónicos y por el contrario su ausencia disminuirla. Se evaluó la presencia o ausencia del APS en los diferentes aislados, que pudieran explicar los diferentes grados de susceptibilidad frente a PMB, utilizando Western blot.

A diferencia de los aislados de pacientes con P. crónica y la cepa ATCC 33277, en los aislados de individuos sanos no se detectó la presencia de APS (Polisacárido aniónico), sugiriendo que *P. gingivalis* presente en un periodonto sano no produce A-LPS o lo pierde (**Figura 10**). Los aislados CP3 y CP4 solo presentaron moléculas de APS de alto peso molecular, mientras que CP1, CP2 y la ATCC 33277 además presentan moléculas de APS de bajo peso molecular.

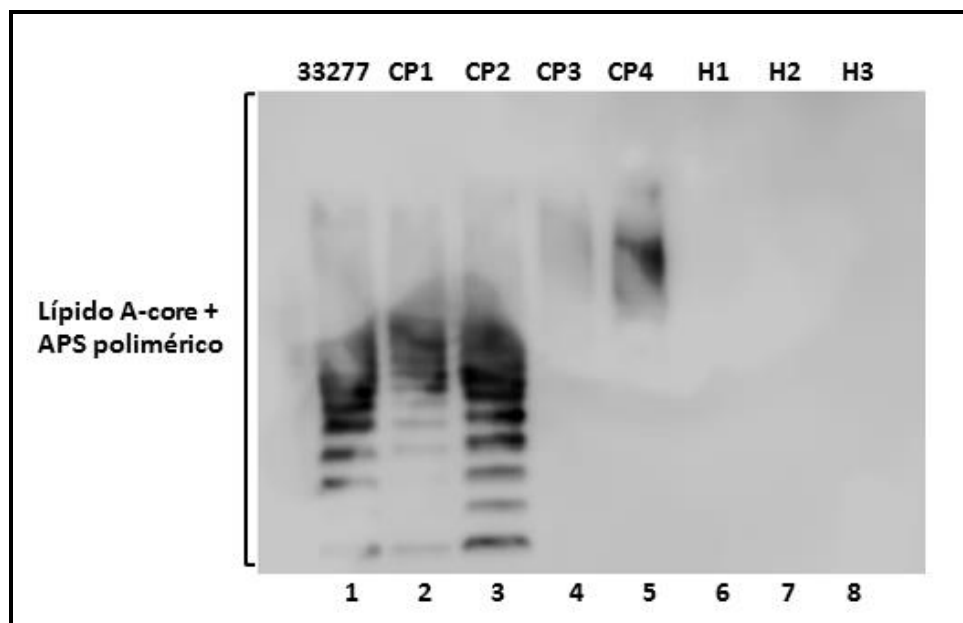


Figura 10. Identificación del A-LPS en aislados clínicos de *P. gingivalis* de pacientes con P. crónica e individuos sanos. Se cargó el LPS purificado a partir de un mismo número de células bacterianas (1×10^7 UFC) en cada carril y se analizó utilizando electroforesis en un gel de poliacrilamida Tricina-SDS y posteriormente western blot con un Mab (1B5) para visualizar el APS. En el carril 1: ATCC 33277, carriles 2-5: aislados de *P. crónica* (CP), carriles 6-8: aislados de individuos sanos (H). A la izquierda se indica la región del APS.

En su conjunto los resultados obtenidos en este objetivo indican que moléculas de AgO y APS de alto peso molecular son relevantes en la resistencia diferencial de los aislados de *P. gingivalis* a los péptidos catiónicos PMB y hBDs-1 a -4.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la participación de modificaciones estructurales del LPS de *P. gingivalis*, de aislados de pacientes con periodontitis crónica e individuos periodontalmente sanos, en la resistencia diferencial a los péptidos catiónicos antimicrobianos PMB y hBDs-1 a -4. Los resultados muestran que aislados de *P. crónica* son significativamente más resistentes a PMB respecto de los aislados de individuos sanos y la cepa control (**Figura 3**). La susceptibilidad exhibida por los aislados de individuos sanos de *P. gingivalis* es comparable a la observada para una cepa mutante (Δ PG1587), que carece del gen que codifica para la fosfatasa 4' del lípido A, a partir de los 25 μ g de PMB (**Tabla 3.2**) (Coats et al. 2009a).

Estos resultados sugieren que la cepa mutante comparte similitudes con los aislados de individuos sanos, las que le confieren una mayor susceptibilidad a PMB respecto de los aislados de *P. crónica* y de la de referencia, ATCC 33277 (Coats et al. 2009a). Lo anterior podría estar relacionado con lo reportado en la literatura en donde la delección de los genes involucrados en la de-fosforilación 4' del lípido A, *lpx* y *PGN_0524*, en cepas de *Francisella tularensis* y *P. gingivalis* respectivamente, resultan en cepas mutantes altamente susceptibles a PMB (Kumada et al. 1995, Wang et al. 2007). Sin embargo, a diferencia de la mutante, los aislados de controles sanos no son susceptibles a los 2,5 μ g de PMB, y en el análisis del gen *PGN_0524* se estableció que todos los aislados de individuos sanos presentan dicho gen (**Figura 4**).

Se encuentra descrito además que la delección en *PGN_0524* se traduce en la incapacidad de la mutante para remover los grupos fosfato en la posición 4' del lípido A, presentando un fenotipo di-fosforilado en las posiciones 1 y 4' de esta región (Coats et al. 2009b). De acuerdo al análisis estructural del lípido A y el tamaño molecular obtenido en los espectros de fragmentación de las señales detectadas, es posible especular que la señal m/z 1475 corresponde a una forma tetra-acilada del lípido A y que las señales m/z 1186 y m/z 1157 son formas tri-aciladas de esta región. El no observarse el intervalo m/z 0-100 en los espectros de fragmentación no permitió establecer la presencia de fosforilaciones. Adicionalmente, los espectros de fragmentación de las cuatro señales

detectadas (**Tabla 3.3**) muestran un fragmento m/z 265 conservado en todas ellas, sugiriendo que comparten estructura (figura representativa, **Figura 6**).

La detección de la señal m/z 1769 sugiere la presencia de lípido A di-fosforilado y penta-acilado (Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006) indistintamente en aislados de individuos sanos (H1 y H2) y de *P. crónica* (CP1, CP2 y CP3). Si bien era posible especular que aislados de *P. crónica* resistentes a PMB no presentaran la estructura di-fosforilada, la señal correspondiente (m/z 1769) estuvo presente en todos ellos, exceptuando en CP4. Estos resultados junto con presencia del gen *PGN_0524* en todos los aislados de individuos sanos susceptibles a PMB indican que, es probable que existan otros puntos de regulación en la fosforilación en 4' del lípido A y que no solo la fosforilación en esta posición está relacionada con la susceptibilidad de los aislados a PMB. Por lo tanto, además de la contribución de la fosfatasa 4' del lípido A, existen otros mecanismos involucrados en la resistencia diferencial de los aislados de *P. gingivalis* a PMB.

Por otra parte, la cepa mutante Δ PG1587 además presentó un menor porcentaje crecimiento en presencia de las hBDs-3 y -4 comparado con la cepa silvestre (**Figura 7**). Las diferencias en el efecto antimicrobiano de las hBDs-3 y -4 sobre la mutante respecto de la cepa ATCC coinciden con una carga catiónica mayor en el caso de las hBDs-3 y -4 (+11 y +7 respectivamente) respecto de las hBDs-1 y -2 (+5 y +6 respectivamente) (Kohlgraf et al. 2010). A diferencia de la mutante, la cepa ATCC 33277 mantuvo e incluso aumentó su % de crecimiento respecto del control sin el antimicrobiano en presencia de las hBDs-3 y -4, no así para las hBDs-1 y -2 en donde el porcentaje de crecimiento fue menor en relación a la mutante. De acuerdo al análisis de nuestros resultados el porcentaje de crecimiento promedio de la mutante para todas las concentraciones de todas las defensinas ensayadas fue significativamente menor respecto de la ATCC 33277 indicando diferencias en la interacción de defensina-bacteria, sin embargo no fue posible determinar la CIM de las cepas. De acuerdo a estos resultados es posible pensar que es necesario incrementar la concentración máxima de defensinas utilizada (20 μ g/mL) en los ensayos pues, si bien existen estudios que respaldan el rango de concentraciones seleccionadas (Shelburne et al. 2005), existen otros estudios en donde la CIM de las hBDs-2 y -3 para la cepa ATCC 33277 fue de 34,6 y 31,3 μ g/mL, respectivamente (Ji et al. 2007, Joly et al. 2004). No obstante la CIM de la cepa ATCC 33277 en presencia de las

defensinas parece ser bastante variable, puesto que según lo reportado por varios autores los valores para las hBDs-2 y -3 se encuentran entre 6,25 - 34,6 y 5,2 - 31,3 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para las hBDs-1 y -4 solo se reportan los valores de 3,13 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Ji et al. 2007, Joly et al. 2004, Shelburne et al. 2005). Lo anterior pudiera estar relacionado con las diferencias en las condiciones en las cuales se han llevado a cabo los ensayos, entre ellas el medio de cultivo, puesto que se ha demostrado que modificaciones en las concentraciones cloruro de sodio (o de varios cationes divalentes) disminuyen la actividad bactericida de las hBDs-1, -2 y -4 (Pazgier et al. 2006). Por lo tanto, las concentraciones de hBDs requeridas para una actividad antimicrobiana efectiva no están claras, a pesar de que se ha determinado que *in vitro* su CIM puede ser mayor que la presente en fluido crevicular gingival (Gorr and Abdolhosseini 2011). Esto apoya la idea de que la función de las hBDs no es solo antimicrobiana, sino que también dependen de ellas otros factores, como la estimulación del sistema inmune (Greer et al. 2013).

Finalmente, a diferencia de lo observado en los ensayos de difusión radial con PMB, la mutante fue capaz de crecer incluso a las concentraciones más altas de cada una de las hBDs ensayadas sugiriendo que junto con la fosforilación en 4' del lípido A, que contribuye en la resistencia de *P. gingivalis* a PMB, existen otros factores involucrados en su susceptibilidad a las hBDs-1 a -4.

Se conoce que las bacterias Gram negativo además son capaces de incrementar la hidrofobicidad del LPS por adición de cadenas lipídicas en los fosfatos del lípido A, disminuyendo la permeabilidad y la susceptibilidad a péptidos catiónicos (Needham and Trent 2013), sin embargo, los estudios realizados en nuestro laboratorio no demuestran una correlación entre la carga neta de los aislados y la susceptibilidad a PMB (publicado en Díaz et al. 2015). Además de la carga neta también se determinó que entre los aislados de individuos sanos y de *P. crónica* existen diferencias en el color y la consistencia de las colonias, así como en la habilidad de autoagregación en medio líquido (Díaz et al. 2015). Estas alteraciones en la macromorfología colonial bacteriana han sido atribuidas a diferencias en la composición capsular, el LPS, la actividad de proteasas de gingipaínas y la habilidad para formar biopelícula (Malone 2015, Marsh et al. 1989, Yamaguchi et al. 2010). Por lo anterior las diferencias macromorfológicas observadas pudieran estar relacionadas con la patogenicidad de los aislados de *P. gingivalis* y la

resistencia a PMB y defensinas, puesto que las características morfológicas coloniales han sido asociadas con la presencia de componentes en la superficie bacteriana (carbohidratos) involucrados en la resistencia a compuestos antimicrobianos (Drenkard and Ausubel 2002, Haussler et al. 2003).

La visualización del LPS de los aislados en geles de SDS-PAGE teñidos con plata demuestra que, a diferencia de los aislados de *P. crónica*, todos los aislados de individuos sanos carecen de moléculas de AgO de alto peso molecular y por tanto presentan un LPS rugoso (**Figura 8**, carriles 6-8) lo cual se corrobora con el análisis densitométrico de los carriles (**Figura 9B**). Se observa además que la región del lípido A-core tiene una menor movilidad electroforética comparado con la cepa de referencia (comparar puntas de flechas rojas en carriles 1, 6, 7 y 8, **Figura 8**) la que puede deberse a la presencia de sustituciones (glicosilaciones) en la región del core del LPS (Martinic et al. 2011). La densitometría de los carriles indicó largos preferenciales de cadena superiores a las 8 unidades de AgO en aislados de *P. crónica*, mientras que el aislado CP4 presentó un LPS con moléculas de AgO de alto peso molecular y con una distribución de los largos de cadena diferente, con una mayor proporción de cadenas cortas e intermedias. Por lo tanto podemos suponer que las diferencias en el patrón de bandeo del LPS pueden estar relacionadas con las susceptibilidad exhibida por los aislados frente a PMB, ya que junto con las modificaciones en el lípido A, diferencias en el AgO y el core han sido implicadas en la resistencia a péptidos antimicrobianos (Ramjeet et al. 2005).

A diferencia de los aislados de *P. crónica*, que poseen moléculas de APS, los aislados de individuos sanos carecen de ellas, indicando que la ausencia de AgO y APS se correlaciona con una mayor susceptibilidad de los aislados a PMB. Estos resultados coinciden con lo descrito por Paterson et al. (2009) los cuales demostraron que cepas de *Salmonella* Typhimurium, produciendo menores cantidades de AgO y polímeros de menor longitud, son más susceptibles a PMB.

Junto con la reducción en los residuos negativos del lípido A del LPS existen otras modificaciones, entre ellas la adición de aminas (fosfoetanolamina, PEtN) y amoniazúcares (Moskowitz et al. 2004), azúcares positivos (Shah et al. 2014) y residuos aminoacídicos (Lewis et al. 2009) sobre los grupos fosfato (Gunn et al. 1998, Llewellyn et al. 2012, Moskowitz et al. 2004, Shah et al. 2014) o sus cadenas de grupos acilo (Lewis et

al. 2009), que permiten que bacterias Gram negativo, como *Pseudomona aeruginosa* (Moskowitz et al. 2004), *Salmonella Typhimurium* (Gunn et al. 1998), *Francisella Novicida* (Llewellyn et al. 2012), algunas especies de *Bordetella* (Shah et al. 2014) y *Neisseria gonorrhoeae* (Lewis et al. 2009) puedan resistir a la acción de péptidos catiónicos (Lewis et al. 2009), como PMB (Gunn et al. 1998).

Sin duda una de las limitaciones de este estudio fue el número de individuos incluidos (3 individuos sanos y 4 con P. crónica). Uno de los motivos es la dificultad que implica aislar *P. gingivalis* desde placa subgingival de individuos sanos, por su baja prevalencia en este tipo de individuos y lo lábil de los aislados a cambios de temperatura, como ocurre en casos de descongelamiento (Aas et al. 2005). A pesar de ello fue posible observar diferencias significativas entre los perfiles de LPS de ambos grupos las que están correlacionadas con diferencias en la susceptibilidad de los aislados a los péptidos catiónicos PMB y hBDs-1 a -4. No obstante, es necesario evaluar las modificaciones químicas del LPS que conducen a la movilidad electroforética observada y sus implicancias en patogenicidad de los aislados. Otra limitación del estudio se relaciona con el reclutamiento de sujetos sin periodontitis, debido a la alta prevalencia de la patología en la población adulta, por esa razón se colocó como un criterio de inclusión tener edad mayor de 18 años en los sujetos periodontalmente sanos comparado con los 35 años de los pacientes con periodontitis. Sin embargo, al realizar la comparación estadística no hay diferencias en el grupo etario de ambos grupos.

Por lo tanto, frente a estos resultados es relevante que en estudios futuros se siga apuntando a la caracterización química del LPS de los aislados, incrementando el número de muestras a partir de individuos sanos y con P. crónica, y establecer si las diferencias observadas en nuestros aislados pueden estar relacionadas con la susceptibilidad frente a otros péptidos catiónicos antimicrobianos.

Los resultados de esta tesis son resumidos en la siguiente figura:

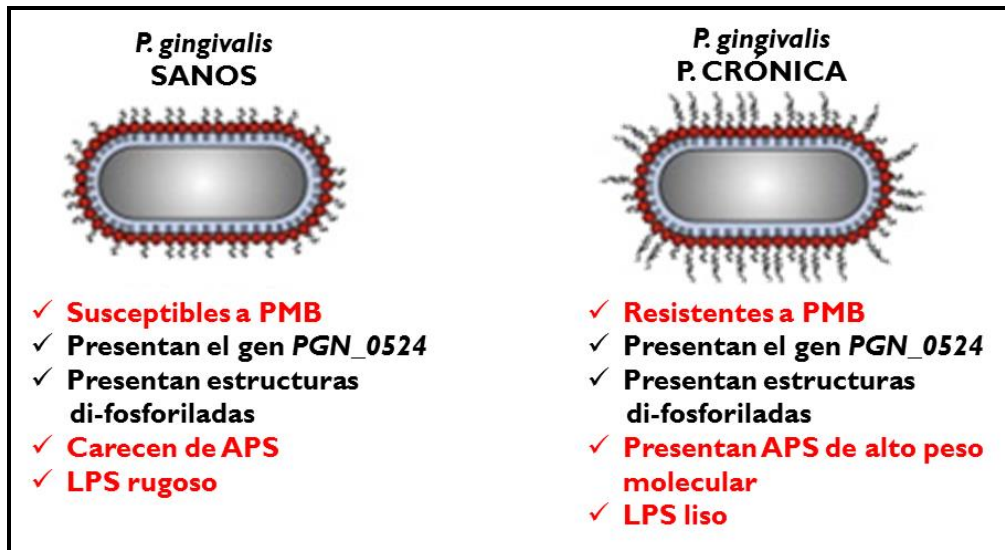


Figura 11. Resumen con los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis. En cada dibujo se aprecian las diferencias estructurales de la superficie bacteriana de acuerdo a lo observado en este estudio. *P. gingivalis* de individuos sanos al igual que de *P. crónica* presenta el gen de la fosftasa en 4' del lípido A (*PGN_0524*), así como las estructuras di-fosforiladas en esta región. A diferencia de los aislados de *P. crónica*, aislados de individuos sanos carecen de moléculas de polisacárido aniónico de alto peso molecular pero además presentan un LPS rugoso, lo cual está correlacionado con la susceptibilidad que presentan al péptido catiónico Polimixina B.

5. CONCLUSIONES

- Los resultados presentados en esta tesis muestran que aislados de *P. gingivalis* provenientes de individuos periodontalmente sanos y de pacientes con P. crónica poseen resistencia diferencial a PMB. Por su parte, aislados de individuos sanos son susceptibles a PMB y presentan una susceptibilidad similar entre ellos, mientras que en el caso de los aislados de P. crónica son resistentes.

- Los aislados de *P. gingivalis* provenientes de individuos periodontalmente sanos, son menos susceptibles a PMB respecto de la cepa mutante delecionada en el gen de la fosfatasa (Δ PG1587) la cual es totalmente susceptible a PMB, pero no así en el caso de las hBDs-1 a -4, sugiriendo que junto con la fosfatasa en 4' del lípido A participan otros mecanismos. Además, aislados de P. crónica e individuos periodontalmente sanos tienen indistintamente el gen de la fosfatasa, *PGN_0524*, y estructuras de lípido A di-fosforilado en las posiciones 1 y 4' de esta región.

- Todos los aislados de pacientes con P. crónica y la cepa ATCC 33277 presentan moléculas de APS de alto peso molecular. Más aún, todos los aislados de individuos con P. crónica presentaron un LPS completo, mientras que todos los aislados de individuos periodontalmente sanos carecen de moléculas de AgO de alto peso molecular y de APS indicando que moléculas de AgO y APS de alto peso molecular están correlacionadas con las diferencias en la susceptibilidad de *P. gingivalis* a los péptidos catiónicos PMB y hBDs-1 a -4.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AAS JA, PASTER BJ, STOKES LN, OLSEN I, DEWHIRST FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5721-5732.
- ABIKO Y, SAITOH M. 2007. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Current Pharmaceutical Design* 13: 3065-3072.
- ABIKO Y, MITAMURA J, NISHIMURA M, MURAMATSU T, INOUE T, SHIMONO M, KAKU T. 1999. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letter* 143: 37-43.
- AL-QUTUB MN, BRAHAM PH, KARIMI-NASER LM, LIU X, GENCO CA, DARVEAU RP. 2006. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect and Immunity* 74: 4474-4485.
- ALTMAN H, STEINBERG D, PORAT Y, MOR A, FRIDMAN D, FRIEDMAN M, BACHRACH G. 2006. *In vitro* assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 198-201.
- ANDRIAN E, GRENIER D, ROUABHIA M. 2004. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect and Immunity* 72: 4689-4698.
- ARMITAGE GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 4: 1-6.
- ASHIMOTO A, CHEN C, BAKKER I, SLOTS J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiology Immunology* 11: 266-273.
- BACHRACH G, ALTMAN H, KOLENBRANDER PE, CHALMERS NI, GABAI-GUTNER M, MOR A, FRIEDMAN M, STEINBERG D. 2008. Resistance of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 to direct killing by antimicrobial peptides is protease independent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 638-642.
- BAINBRIDGE BW, COATS SR, DARVEAU RP. 2002. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Annals of Periodontology* 7: 29-37.
- BEREZOW AB, ERNST RK, COATS SR, BRAHAM PH, KARIMI-NASER LM, DARVEAU RP. 2009. The structurally similar, penta-acylated lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* and

- Bacteroides elicit strikingly different innate immune responses. *Microbial Pathogenesis* 47: 68-77.
- BISSELL J, JOLY S, JOHNSON GK, ORGAN CC, DAWSON D, MCCRAY PB, JR., GUTHMILLER JM. 2004. Expression of beta-defensins in gingival health and in periodontal disease. *Journal Oral Pathology and Medicine* 33: 278-285
- BONASS WA, HIGH AS, OWEN PJ, DEVINE DA. 1999. Expression of beta-defensin genes by human salivary glands. *Oral Microbiology Immunology* 14: 371-374.
- BRAVO D, HOARE A, SILIPO A, VALENZUELA C, SALINAS C, ALVAREZ SA, MOLINARO A, VALVANO MA, CONTRERAS I. 2011. Different sugar residues of the lipopolysaccharide outer core are required for early interactions of *Salmonella* enterica serovars Typhi and Typhimurium with epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 50: 70-80.
- BRAVO D. 2010. Tesis para optar al grado de doctor en bioquímica. Participación del lipopolisacárido (LPS) en la interacción inicial de *Salmonella* Typhi y Typhimurium con células epiteliales.
- BUGUEÑO I. 2014. Tesis para optar al grado de cirujano dentista. Caracterización de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* y su efecto en la viabilidad de células epiteliales gingivales.
- BYRNE SJ, DASHPER SG, DARBY IB, ADAMS GG, HOFFMANN B, REYNOLDS EC. 2009. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiology Immunology* 24: 469-477.
- CARLISLE MD, SRIKANTHA RN, BROGDEN KA. 2009. Degradation of human alpha- and beta-defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381. *Journal of Innate Immunity* 1: 118-122.
- CLARK WB, LOE H. 1993. Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology* 2000 2: 72-82
- COATS SR, TO TT, JAIN S, BRAHAM PH, DARVEAU RP. 2009a. *Porphyromonas gingivalis* resistance to polymyxin B is determined by the lipid A 4'-phosphatase, PGN_0524. *International Journal of Oral Science* 1: 126-135.
- COATS SR, BEREZOW AB, TO TT, JAIN S, BAINBRIDGE BW, BANANI KP, DARVEAU RP. 2011. The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. *Infection and Immunity* 79: 203-210.
- COATS SR, JONES JW, DO CT, BRAHAM PH, BAINBRIDGE BW, TO TT, GOODLETT DR, ERNST RK, DARVEAU RP. 2009b. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cellular Microbiology* 11: 1587-1599.

- CUDIC M, OTVOS L, JR. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug Targets* 3: 101-106.
- CUGINI C, KLEPAC-CERAJ V, RACKAITYTE E, RIGGS JE, DAVEY ME. 2013. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *Journal of Oral Microbiology* 5.
- CURTIS MA, THICKETT A, SLANEY JM, RANGARAJAN M, ADUSE-OPOKU J, SHEPHERD P, PARAMONOV N, HOUNSELL EF. 1999. Variable carbohydrate modifications to the catalytic chains of the RgpA and RgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infection and Immunity* 67: 3816-3823.
- CURTIS MA, PERCIVAL RS, DEVINE D, DARVEAU RP, COATS SR, RANGARAJAN M, TARELLI E, MARSH PD. 2011. Temperature-dependent modulation of *Porphyromonas gingivalis* lipid A structure and interaction with the innate host defenses. *Infection and Immunity* 79: 1187-1193.
- CHEN T, YU WH, IZARD J, BARANOVA OV, LAKSHMANAN A, DEWHIRST FE. 2010. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)* 2010: baq013.
- DALE BA, KRISANAPRAKORNKIT S. 2001. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 30: 321-327.
- DALE BA, FREDERICKS LP. 2005. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current Issues in Molecular Biology* 7: 119-133.
- DALE BA, KIMBALL JR, KRISANAPRAKORNKIT S, ROBERTS F, ROBINOVITCH M, O'NEAL R, VALORE EV, GANZ T, ANDERSON GM, WEINBERG A. 2001. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *Journal of Periodontal Research* 36: 285-294.
- DARVEAU RP, PHAM TT, LEMLEY K, REIFE RA, BAINBRIDGE BW, COATS SR, HOWALD WN, WAY SS, HAJJAR AM. 2004. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity* 72: 5041-5051.
- DÍAZ L, ET AL. 2015. Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe* 33: 25-32.
- DICKINSON DP, KUBINIEC MA, YOSHIMURA F, GENCO RJ. 1988. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Bacteriology* 170: 1658-1665.
- OMMISCH H, ACIL Y, DUNSCHKE A, WINTER J, JEPSEN S. 2005. Differential gene expression of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiology Immunology* 20: 186-190.

- DRENKARD E, AUSUBEL FM. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740-743
- DZINK JL, SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. 1988. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 15: 316-32
- FENG Z, DUBYAK GR, LEDERMAN MM, WEINBERG A. 2006. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *Journal of Immunology* 177: 782-786.
- FUJIWARA T, OGAWA T, SOBUE S, HAMADA S. 1990. Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *Journal of General Microbiology* 136: 319-326.
- GAMONAL J, MENDOZA C, ESPINOZA I, MUNOZ 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.
- GANZ T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Review Immunology* 3: 710-720.
- GANZ T, LEHRER RI. 1995. Defensins. *Pharmacological Therapy* 66: 191-205.
- GARCIA JR, ET AL. 2001. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell and Tissue Research* 306: 257-264.
- GENCO CA, POTEMPA J, MIKOLAJCZYK-PAWLINSKA J, TRAVIS J. 1999. Role of gingipains R in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Clinical Infectious Disease* 28: 456-465
- GORR SU, ABDOLHOSSEINI M. 2011. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 38 Suppl 11: 126-141.
- GREER A, ZENOBIA C, DARVEAU RP. 2013. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium. *Periodontology 2000* 63: 67-79.
- GUNN JS, LIM KB, KRUEGER J, KIM K, GUO L, HACKETT M, MILLER SI. 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular Microbiology* 27: 1171-1182.
- GUTHMILLER JM, VARGAS KG, SRIKANTHA R, SCHOMBERG LL, WEISTROFFER PL, MCCRAY PB, JR., TACK BF. 2001. Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3216-3219.

- HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5: 78-111
- HAJISHENGALLIS G, LAMONT RJ. 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.
- HAJISHENGALLIS G, DARVEAU RP, CURTIS MA. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Review of Microbiology* 10: 717-725.
- HAJISHENGALLIS G, WANG M, LIANG S, SHAKHATREH MA, JAMES D, NISHIYAMA S, YOSHIMURA F, DEMUTH DR. 2008. Subversion of innate immunity by periodontopathic bacteria via exploitation of complement receptor-3. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 632: 203-219.
- HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, SCHRODER JM. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 276: 5707-5713.
- HAUSSLER S, ZIEGLER I, LOTTEL A, VON GOTZ F, ROHDE M, WEHMHÖHNER D, SARAVANAMUTHU S, TUMMLER B, STEINMETZ I. 2003. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology* 52: 295-301.
- HAZRATI E, GALEN B, LU W, WANG W, OUYANG Y, KELLER MJ, LEHRER RI, HEROLD BC. 2006. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *Journal of Immunology* 177: 8658-8666.
- HERATH TD, WANG Y, SENEVIRATNE CJ, LU Q, DARVEAU RP, WANG CY, JIN L. 2011. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. *Journal of Clinical Periodontology* 38: **694-701**.
- HOLT SC, KESAVALU L, WALKER S, GENCO CA. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 20: 168-238
- HOULE MA, GRENIER D, PLAMONDON P, NAKAYAMA K. 2003. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiology Letters* 221: 181-185.
- JAIN S, DARVEAU RP. 2010. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology* 2000 54: 53-70.
- JI S, HYUN J, PARK E, LEE BL, KIM KK, CHOI Y. 2007. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *Journal of Periodontal Research* 42: 410-419.

- JOLY S, MAZE C, MCCRAY PB, JR., GUTHMILLER JM. 2004. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1024-1029.
- KESIC L, MILASIN J, IGIC M, OBRADOVIC R. 2008. Microbial etiology of periodontal disease—mini review. *Medicine and biology* 15: 1-6.
- KINANE DF, LAPPIN DF. 2002. Immune processes in periodontal disease: a review. *Annals of Periodontology* 7: 62-71.
- KLOTMAN ME, CHANG TL. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Review of Immunology* 6: 447-456
- KOHLGRAF KG, PINGEL LC, DIETRICH DE, BROGDEN KA. 2010. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiology* 5: 99-113.
- KOLENBRANDER PE, LONDON J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology* 175: 3247-3252.
- KOPRIVNJAK T, PESCHEL A. 2011. Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2243-2254.
- KRISANAPRAKORNKIT S, WEINBERG A, PEREZ CN, DALE BA. 1998. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infection and Immunity* 66: 4222-4228.
- KRISANAPRAKORNKIT S, KIMBALL JR, WEINBERG A, DARVEAU RP, BAINBRIDGE BW, DALE BA. 2000. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infection and Immunity* 68: 2907-2915.
- KUMADA H, HAISHIMA Y, UMEMOTO T, TANAMOTO K. 1995. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* 177: 2098-2106.
- KURLAND AR, SCHREINER H, DIAMOND G. 2006. *In vivo* beta-defensin gene expression in rat gingival epithelium in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Journal of Periodontal Research* 41: 567-572.
- LAMONT RJ, JENKINSON HF. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62: 1244-1263
- LESSE AJ, CAMPAGNARI AA, BITTNER WE, APICELLA MA. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Immunological Methods* 126: 109-117.

- LEWIS LA, CHOUDHURY B, BALTHAZAR JT, MARTIN LE, RAM S, RICE PA, STEPHENS DS, CARLSON R, SHAFER WM. 2009. Phosphoethanolamine substitution of lipid A and resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to cationic antimicrobial peptides and complement-mediated killing by normal human serum. *Infection and Immunity* 77: 1112-1120.
- LU Q, JIN L, DARVEAU RP, SAMARANAYAKE LP. 2004. Expression of human beta-defensins-1 and -2 peptides in unresolved chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 39: 221-227.
- LU Q, SAMARANAYAKE LP, DARVEAU RP, JIN L. 2005. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *Journal of Periodontal Research* 40: 474-481.
- LLEWELLYN AC, ET AL. 2012. NaxD is a deacetylase required for lipid A modification and *Francisella* pathogenesis. *Molecular Microbiology* 86: 611-627.
- MAISETTA G, BATONI G, ESIN S, RACO G, BOTTAI D, FAVILLI F, FLORIO W, CAMPA M. 2005. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1245-1248.
- MAISETTA G, BATONI G, ESIN S, LUPERINI F, PARDINI M, BOTTAI D, FLORIO W, GIUCA MR, GABRIELE M, CAMPA M. 2003. Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3349-3351.
- MALONE JG. 2015. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infection and Drug Resistance* 8: 237-247.
- MANSHEIM BJ, ONDERDONK AB, KASPER DL. 1978. Immunochemical and biologic studies of the lipopolysaccharide of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *saccharolyticus*. *Journal of Immunology* 120: 72-78.
- MAROLDA CL, LAHIRY P, VINES E, SALDIAS S, VALVANO MA. 2006. Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods in Molecular Biology* **347: 237-252.**
- MARSH PD, MCKEE AS, MCDERMID AS, DOWSETT AB. 1989. Ultrastructure and enzyme activities of a virulent and an avirulent variant of *Bacteroides gingivalis* W50. *FEMS Microbiology Letters* 50: 181-185.
- MARTINIC M, HOARE A, CONTRERAS I, ALVAREZ SA. 2011. Contribution of the lipopolysaccharide to resistance of *Shigella flexneri* 2a to extreme acidity. *PLoS One* 6: e25557

- MATHEWS M, JIA HP, GUTHMILLER JM, LOSH G, GRAHAM S, JOHNSON GK, TACK BF, MCCRAY PB, JR. 1999. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infection and Immunity* 67: 2740-2745.
- MINEOKA T, AWANO S, RIKIMARU T, KURATA H, YOSHIDA A, ANSAI T, TAKEHARA T. 2008. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *Journal of Periodontology* 79: 670-676.
- MOMBELLI A, MCNABB H, LANG NP. 1991a. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 26: 308-313.
- MOMBELLI A, MCNABB H, LANG NP. 1991b. Black-pigmented gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. *Journal of Periodontal Research* 26: 301-307.
- MOSKOWITZ SM, ERNST RK, MILLER SI. 2004. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of Bacteriology* 186: 575-579.
- NAIR BC, MAYBERRY WR, DZIAK R, CHEN PB, LEVINE MJ, HAUSMANN E. 1983. Biological effects of a purified lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 18: 40-49.
- NEEDHAM BD, TRENT MS. 2013. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Review of Microbiology* 11: 467-481.
- NICHOLS FC, BAJRAMI B, CLARK RB, HOUSLEY W, YAO X. 2012. Free lipid A isolated from *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is contaminated with phosphorylated dihydroceramide lipids: recovery in diseased dental samples. *Infection and Immunity* 80: 860-874.
- NIKAIDO H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biological Review* 67: 593-656.
- NIKAIDO H, VAARA M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews* 49: 1-32.
- NISH S, MEDZHITOV R. 2011. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity* 34: 629-636.
- NIYONSABA F, OGAWA H. 2005. Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *Journal of Dermatological Science* 40: 157-168.

- NIYONSABA F, SOMEYA A, HIRATA M, OGAWA H, NAGAOKA I. 2001. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *European Journal of Immunology* 31: 1066-1075.
- NJOROGE T, GENCO RJ, SOJAR HT, HAMADA N, GENCO CA. 1997. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infection and Immunity* 65: 1980-1984.
- OGAWA T. 1993. Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Letters* 332: 197-201.
- OGAWA T, YAGI T. 2010. Bioactive mechanism of *Porphyromonas gingivalis* lipid A. *Periodontology* 2000 54: 71-77.
- OGAWA T, ASAI Y, MAKIMURA Y, TAMAI R. 2007. Chemical structure and immunobiological activity of *Porphyromonas gingivalis* lipid A. *Frontiers in Bioscience* 12: 3795-3812.
- OLCZAK T, SIMPSON W, LIU X, GENCO CA. 2005. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiological Reviews* 29: 119-144.
- OUHARA K, KOMATSUZAWA H, YAMADA S, SHIBA H, FUJIWARA T, OHARA M, SAYAMA K, HASHIMOTO K, KURIHARA H, SUGAI M. 2005. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 888-896.
- PARAMONOV N, ADUSE-OPOKU J, HASHIM A, RANGARAJAN M, CURTIS MA. 2015. Identification of the linkage between A-polysaccharide and the core in the A-lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Journal of Bacteriology* 197: 1735-1746.
- PARAMONOV N, BAILEY D, RANGARAJAN M, HASHIM A, KELLY G, CURTIS MA, HOUNSELL EF. 2001. Structural analysis of the polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* strain W50. *European Journal of Biochemistry* 268: 4698-4707.
- PARAMONOV N, RANGARAJAN M, HASHIM A, GALLAGHER A, ADUSE-OPOKU J, SLANEY JM, HOUNSELL E, CURTIS MA. 2005. Structural analysis of a novel anionic polysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* strain W50 related to Arg-gingipain glycans. *Molecular Microbiology* 58: 847-863.
- PARAMONOV NA, ADUSE-OPOKU J, HASHIM A, RANGARAJAN M, CURTIS MA. 2009. Structural analysis of the core region of O-lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* from mutants defective in O-antigen ligase and O-antigen polymerase. *Journal of Bacteriology* 191: 5272-5282.
- PARKER CT, KLOSER AW, SCHNAITMAN CA, STEIN MA, GOTTESMAN S, GIBSON BW. 1992. Role of the rfaG and rfaP genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 174: 2525-2538.

- PATERSON GK, CONE DB, PETERS SE, MASKELL DJ. 2009. The enzyme phosphoglucomutase (Pgm) is required by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for O-antigen production, resistance to antimicrobial peptides and in vivo fitness. *Microbiology* 155: 3403-3410.
- PATHIRANA RD, O'BRIEN-SIMPSON NM, REYNOLDS EC. 2010. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology* 2000 52: 218-237.
- PAZGIER M, HOOVER DM, YANG D, LU W, LUBKOWSKI J. 2006. Human beta-defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 1294-1313.
- PETERSEN PE, BOURGEOIS D, OGAWA H, ESTUPINAN-DAY S, NDIAYE C. 2005. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization* 83: 661-669.
- POMAHAC B, SVENSJO T, YAO F, BROWN H, ERIKSSON E. 1998. Tissue engineering of skin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 9: 333-344
- PRESLAND RB, DALE BA. 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 11: 383-40
- PULENDRAN B, KUMAR P, CUTLER CW, MOHAMADZADEH M, VAN DYKE T, BANCHEREAU J. 2001. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *Journal of Immunology* 167: 5067-5076
- RAETZ CR, WHITFIELD C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71: 635-700.
- RAMJEET M, DESLANDES V, ST MICHAEL F, COX AD, KOBISCH M, GOTTSCHALK M, JACQUES M. 2005. Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Journal of Biological Chemistry* 280: 39104-39114.
- RANGARAJAN M, ADUSE-OPOKU J, PARAMONOV N, HASHIM A, BOSTANCI N, FRASER OP, TARELLI E, CURTIS MA. 2008. Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *Journal of Bacteriology* 190: 2920-2932.
- REIFE RA, COATS SR, AL-QUTUB M, DIXON DM, BRAHAM PA, BILLHARZ RJ, HOWALD WN, DARVEAU RP. 2006. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cellular Microbiology* 8: 857-868
- RIETSCHEL ET, ET AL. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB Journal* 8: 217-225.

- SAHL HG, PAG U, BONNESS S, WAGNER S, ANTCHEVA N, TOSSI A. 2005. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *Journal of Leukocyte Biology* 77: 466-475.
- SHAH NR, HANCOCK RE, FERNANDEZ RC. 2014. *Bordetella pertussis* lipid A glucosamine modification confers resistance to cationic antimicrobial peptides and increases resistance to outer membrane perturbation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 4931-4934.
- SHELBURNE CE, COULTER WA, OLGUIN D, LANTZ MS, LOPATIN DE. 2005. Induction of {beta}-defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 183-187.
- SLOTS J. 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 6: 351-382.
- SLOTS J, REYNOLDS HS. 1982. Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented *Bacteroides spp.* *Journal of Clinical Microbiology* 16: 1148-1151.
- SMITH M, SEYMOUR GJ, CULLINAN MP. 2010. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* 53: 45-54.
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. 2002. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* 28: 12-55.
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL, JR. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25: 134-144.
- TAGUCHI Y, IMAI H. 2006. Expression of beta-defensin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with *Porphyromonas gingivalis in vitro*. *Journal of Periodontal Research* 41: 334-339.
- TAKADA K, HIRASAWA M. 1998. Isolation and characterization of non-pigmented rough colony of *Porphyromonas gingivalis* from periodontitis. *Anaerobe* 4: 233-240.
- TAO R, JUREVIC RJ, COULTON KK, TSUTSUI MT, ROBERTS MC, KIMBALL JR, WELLS N, BERNDT J, DALE BA. 2005. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 3883-3888.
- TSAI CM, FRASCH CE. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 119: 115-119.
- VANKEERBERGHEN A, NUYTEN H, DIERICKX K, QUIRYNEN M, CASSIMAN JJ, CUPPENS H. 2005. Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *Journal of Periodontology* 76: 1293-1303.

- VARDAR-SENGUL S, DEMIRCI T, SEN BH, ERKIZAN V, KURULGAN E, BAYLAS H. 2007. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research* 42: 429-437.
- WANG X, RIBEIRO AA, GUAN Z, ABRAHAM SN, RAETZ CR. 2007. Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104: 4136-4141.
- 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: 3801-3812.
- YAMASHITA T, SAITO K. 1989. Purification, primary structure, and biological activity of guinea pig neutrophil cationic peptides. *Infection and Immunity* 57: 2405-2409.
- ANG D, CHERTOV O, OPPENHEIM JJ. 2001. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *Journal of Leukocyte Biology* 69: 691-697.
- YANG D, CHEN Q, CHERTOV O, OPPENHEIM JJ. 2000. Human neutrophil defensins selectively chemoattract native T and immature dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 9-14.
- YANG D, BIRAGYN A, HOOVER DM, LUBKOWSKI J, OPPENHEIM JJ. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology* 22: 181-215.
- YANG D, ET AL. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525-528.
- YIN L, CHINO T, HORST OV, HACKER BM, CLARK EA, DALE BA, CHUNG WO. 2010. Differential and coordinated expression of defensins and cytokines by gingival epithelial cells and dendritic cells in response to oral bacteria. *BMC Immunology* 11: 37.
- YOSHIMURA F, MURAKAMI Y, NISHIKAWA K, HASEGAWA Y, KAWAMINAMI S. 2009. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 44: 1-12.

7. ANEXOS

Tabla anexa 6.1. Características clínicas de los pacientes con P. crónica e individuos sanos reclutados.

	P. CRÓNICA (N=16)	INDIVIDUOS SANOS (N=11)
EDAD (Prom ± DS)	43.4 ± 11,0 [°]	34.5 ± 9,3 [°]
PS (mm, Prom ± DS)	3.2 ± 0.2 [#]	2.0 ± 0.1 [#]
NIC (mm, Prom ± DS)	3.9 ± 0.3 [*]	1.4 ± 0.2 [*]
% de sitios con placa	71.7 ± 5.9 [§]	29.0 ± 5.4 [§]
% de sitios BOP	53.4 ± 5.3 [‡]	24.9 ± 4.0 [‡]
% de sitios con PS ≥ 5mm	20.1 ± 15.5	0
% de sitios con NIC ≥ 3 mm	32.3 ± 20.8	0

°Promedio de edad de pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,037$

#Promedio de profundidad de sondaje de pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,001$

*Promedio del nivel de inserción clínico de pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,001$

§Porcentaje de sitios con placa en pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,001$

‡Porcentaje de sitios con sangrado al sondaje en pacientes con P. crónica *versus* individuos sanos: $p < 0,002$

Tabla anexa 6.2. Resumen de los resultados para la identificación de *P. gingivalis* a partir de pacientes con P. crónica (CP) e individuos sanos (H) reclutados en este estudio.

PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA (CP) Y SANOS (H)	IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>Porphyromonas</i> POR FLUORESCENCIA EN METANOL	IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>P. gingivalis</i> POR PCR	IDENTIFICACIÓN DE <i>P. gingivalis</i> EN RTF POR PCR	DESTINACIÓN
CP1	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
CP2	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
CP3	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
CP4	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
CP5	-	+	-	DESCARTADA
CP6	+	+	-	DESCARTADA
CP7	+	+	+	DESCARTADA
CP8	+	+	+	DESCARTADA
CP9	+	+	+	DESCARTADA
CP10	+	+	+	DESCARTADA
CP11	+	+	+	DESCARTADA
CP12	+	+	+	DESCARTADA
CP13	+	-	-	DESCARTADA
CP14	+	-	-	DESCARTADA
CP15	+	+	+	DESCARTADA
CP16	+	+	+	DESCARTADA
H1	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
H2	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
H3	+	+	+	USADA EN ESTE ESTUDIO
H4	-	-	-	DESCARTADA
H5	+	-	-	DESCARTADA
H6	-	+	+	DESCARTADA
H7	-	+	-	DESCARTADA
H8	-	-	-	DESCARTADA
H9	-	-	-	DESCARTADA
H10	+	-	-	DESCARTADA
H11	+	-	-	DESCARTADA

Tabla anexa 6.3. Resultado de los análisis de los ensayos de susceptibilidad de los aislados clínicos *versus* la cepa de referencia ATCC 33277 para cada concentración de PMB (0–275 µg/mL) ensayada.

Concentración [µg/mL]	10	20	30	40	50	75	100	150	200	225	250	275
33277 v/s CP1	-24,6 ⁿ	12,93 ⁿ	-14,45 ⁿ	-11,12 ⁿ	-17,50 ⁿ	-23,20 ^{**}	-23,00 ⁿ	-20,73 ⁿ	-55,77 ⁿ	-17,33 ⁿ	-16,43 ⁿ	-19,00 ⁿ
33277 v/s CP2	-72,67 ^{**}	-43,43 ^{**}	-78,33 ^{***}	-81,80 ^{***}	-95,63 ^{***}	-63,58 ^{***}	-55,37 [*]	-40,90 ^{**}	-35,50 ⁿ	-27,00 ⁿ	-13,90 ⁿ	-21,00 ⁿ
33277 v/s CP4	-68,73 ^{**}	-28,17 [*]	-69,57 ^{***}	-71,87 ^{***}	-81,00 ^{***}	-72,93 ^{***}	-73,67 ^{**}	-58,73 ^{***}	-85,13 ^{**}	-70,87 [*]	-86,10 ^{***}	-67,60 ^{**}
33277 v/s CP3	-52,63 [*]	-15,60 ⁿ	-48,77 ^{***}	-52,20 ^{***}	-67,67 ^{***}	-77,77 ^{***}	-84,50 ^{***}	-80,37 ^{***}	-75,57 [*]	-64,83 [*]	-60,27 [*]	-58,10 ^{**}
33277 v/s H1	-84,95 ^{***}	-110,2 ^{***}	-165,2 ^{***}	-155,0 ^{***}	-173,4 ^{***}	-177,8 ^{***}	-241,7 ^{***}	-254,6 ^{***}	-122,0 ^{***}	-113,9 ^{***}	-97,55 ^{***}	-84,19 ^{***}
33277 v/s H2	-72,13 [*]	-36,95 [*]	-68,17 ^{***}	-69,62 ^{***}	-82,27 ^{***}	-94,26 ^{***}	-99,23 ^{***}	-116,6 ^{***}	-103,3 ^{**}	-119,8 ^{***}	-112,1 ^{***}	-99,93 ^{***}
33277 v/s H3	27,10 ⁿ	61,75 ^{***}	32,90 ^{**}	30,63 ^{**}	18,59 ⁿ	9,353 ⁿ	1,374 ⁿ	-1,276 ⁿ	-0,126 ⁿ	-0,4830 ⁿ	-1,378 ⁿ	-2,199 ⁿ

ⁿSin significancia estadística

^{*}Diferencia promedio con un $p < 0,05$

^{**}Diferencia promedio con un $p < 0,01$

^{***}Diferencia promedio con un $p < 0,001$

Tabla anexa 6.4. Especies de lípido A descritas para *P. gingivalis*. Para cada especie se indica su fórmula, su masa nominal (Mn), masa promedio (Mp), masa monoisotópica (Mi) y su correspondiente señal m/z (*).

Fórmula	Mn (g/mol)	Mp (g/mol)	Mi (g/mol)	m/z	Referencias
C ₃₈ H ₇₄ NO ₁₂ P	767	767.9689	767.4949	766	(Kumada et al. 1995)
C ₃₉ H ₇₆ NO ₁₂ P	781	781.9956	781.5105	780	(Kumada et al. 1995)
C ₄₆ H ₈₉ N ₂ O ₁₆ P	956	957.1783	956.5950	955	(Kumada et al. 1995)
C ₄₆ H ₉₀ N ₂ O ₁₉ P ₂	1036	1037.1582	1036.5613	1035	(Kumada et al. 1995)
C ₆₂ H ₁₁₉ N ₂ O ₁₇ P	1194	1195.5877	1194.8246	1193	(Al-Qutub et al. 2006, Darveau et al. 2004, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006)
C ₇₈ H ₁₄₈ N ₂ O ₁₆	1368	1370.0166	1369.0829	1368	(Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995)
C ₇₇ H ₁₄₇ N ₂ O ₁₉ P	1434	1435.9699	1435.0336	1434	(Al-Qutub et al. 2006, Darveau et al. 2004, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006)
C ₇₈ H ₁₄₉ N ₂ O ₁₉ P	1448	1449.9965	1449.0492	1448	(Al-Qutub et al. 2006, Darveau et al. 2004, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006)
C ₇₇ H ₁₄₈ N ₂ O ₂₂ P ₂	1514	1515.9498	1514.9999	1514	(Kumada et al. 1995)
C ₇₈ H ₁₅₀ N ₂ O ₂₂ P ₂	1528	1529.9764	1529.0155	1528	(Kumada et al. 1995)
C ₉₃ H ₁₇₇ N ₂ O ₂₁ P	1688	1690.3787	1689.2581	1688	(Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006)
C ₉₃ H ₁₇₈ N ₂ O ₂₄ P ₂	1768	1770.3586	1769.2245	1769	(Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006)

(*) En la literatura se pueden encontrar algunas diferencias en las señales m/z indicadas para algunas especies de lípido A, como para la especie di-fosforilada penta-acilada m/z 1769 que se puede encontrar como m/z 1770 (Al-Qutub et al. 2006, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006) o alternativamente como m/z 1768 (Coats et al. 2009b); la especie mono-fosforilada penta-acilada m/z 1688 que se puede encontrar como m/z 1690 (Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006), m/z 1689 (Al-Qutub et al. 2006, Coats et al. 2009b, Kumada et al. 1995, Reife et al. 2006) o m/z 1688 (Coats et al. 2011, Coats et al. 2009b) entre otras lo que se debería a la masa empleada para el cálculo, en esta tesis se utilizó la distribución isotópica para una mejor estimación de la señal m/z esperada.

Tabla anexa 6.5. Resultado de los análisis de los ensayos de susceptibilidad de la cepa de referencia ATCC 33277 para *versus* la mutante Δ PG1587 en presencia de la hBDs-1 a -4 (0–20 μ g/mL).

Prueba de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: crecimiento

Recurso	Suma de los cuadrados, Tipo III	grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Factor	Significancia
Modelo corregido	88986,423 ^a	31	2870,530	4,962	,000
Intercepto	847585,698	1	847585,698	1465,249	,000
Defensinas	3073,058	3	1024,353	1,771	,173
Concentración	141,839	3	47,280	,082	,969
Bacteria	73871,450	1	73871,450	127,704	,000
Defensinas * Concentración	917,865	9	101,985	,176	,995
Defensinas * Bacteria	9629,652	3	3209,884	5,549	,003
Concentración * Bacteria	135,144	3	45,048	,078	,972
Defensinas * Concentración * Bacteria	1217,414	9	135,268	,234	,987
Error	18510,665	32	578,458		
Total	955082,787	64			
Total corregido	107497,089	63			

a. $R^2 = ,828$ (R^2 ajustado = ,661)

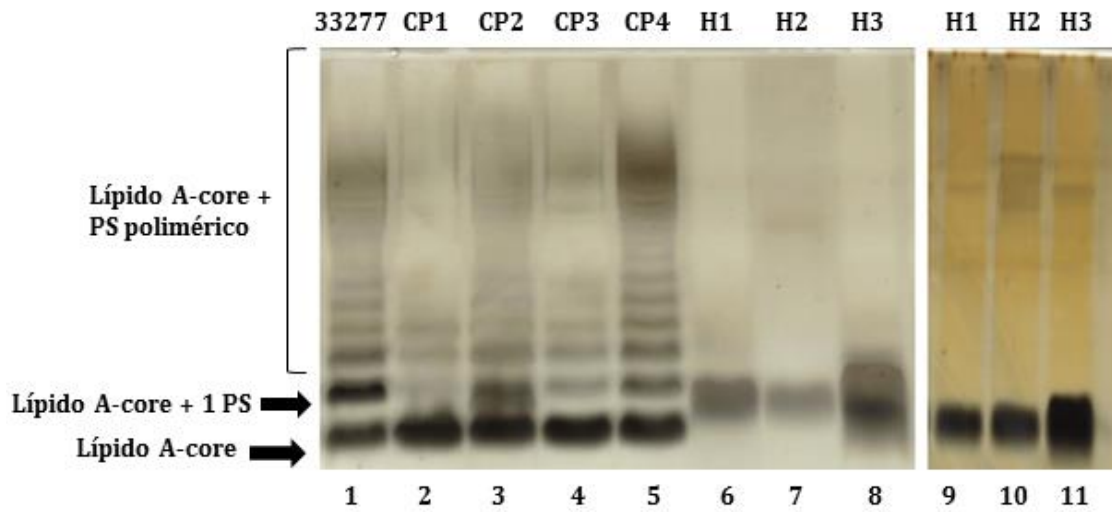


Figura anexa 1. Control de carga de los perfiles de LPS de aislados clínicos de *P. gingivalis* de pacientes con P. crónica y cepa de referencia versus individuos sanos. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de Tricina-SDS-poliacrilamida seguido por la tinción con plata. La carga bacteriana fue estandarizada al inicio del protocolo de extracción (1×10^7 UFC). En la figura se muestran: carril 1: ATCC 33277, carril 2-5: aislados clínicos de pacientes con P. crónica (CP), carriles 6-8: aislados clínicos de individuos sanos (H), carriles 9-11: estos fueron cargado con una cantidad 5 veces mayor de LPS. Las diferentes regiones del LPS se indican a la izquierda. La región del polisacárido (PS) comprende el AgO y el polisacárido aniónico (APS).

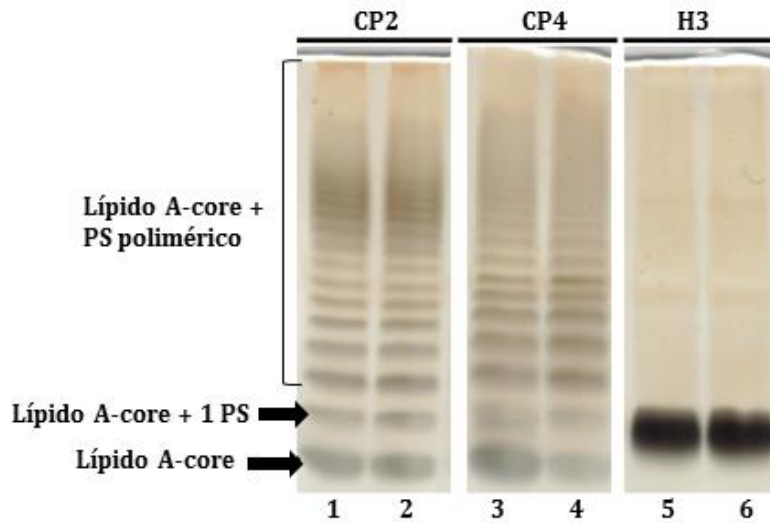


Figura anexa 2. Imagen representativa de los perfiles de LPS de diferentes aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de un mismo paciente con P. crónica o de individuos sanos. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de Tricina-SDS-poliacrilamida seguido por la tinción con plata. La carga bacteriana fue estandarizada al inicio del protocolo de extracción (1×10^7 UFC). En la figura se muestran: carril 1 y 2: aislados clínicos de P. crónica CP2, carril 3 y 4: aislados clínicos de P. crónica CP4, carriles 5 y 6: aislados clínicos de control sano H3. Las diferentes regiones del LPS se indican a la izquierda. La región del polisacárido (PS) comprende el AgO y el polisacárido aniónico (APS).

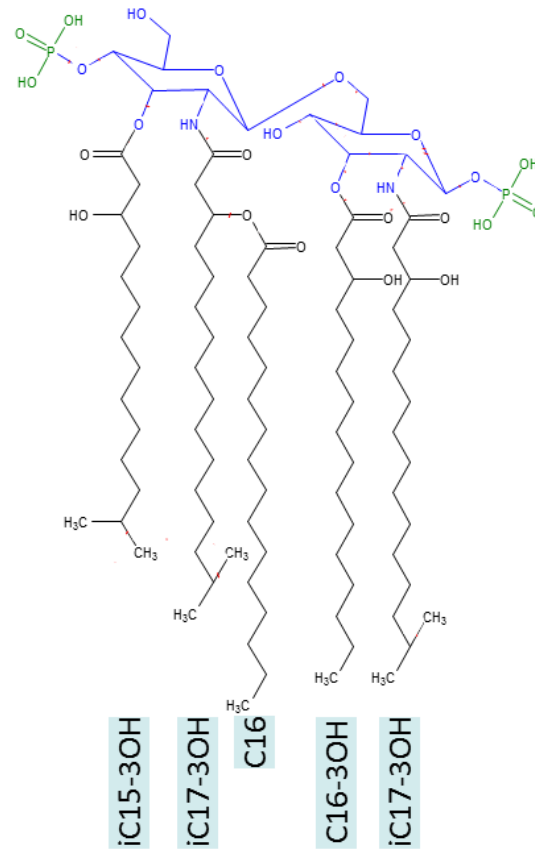


Figura anexa 3. Esquema estructural del lípido A 1,4' di-fosforilado y penta-acilado de *P. gingivalis*. En la figura se aprecia la estructura del lípido A constituido por dos unidades de glucosamina (azul) unidas por enlace β 1-6, fosforiladas en las posiciones 1 y 4' (verde) esterificado con ácidos grasos (negro) de longitud variable (iC15-3OH, iC16-3OH, iC16 e iC17-3OH) indicados en la parte inferior de la figura.