



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Patología y Medicina Oral**  
**Laboratorio de Microbiología**

**El Antígeno O de *Porphyromonas gingivalis* participa en la  
modulación de los niveles de Interleuquina-8 y de la  
migración en células epiteliales gingivales**

Memoria para optar al título de Bioquímico

**Ana Victoria Rojas Celis**

Directores de Memoria:  
Denisse Bravo Rodríguez  
Facultad de Odontología  
Andrew Quest Minikus  
Facultad de Medicina

Profesor Patrocinante:  
Dr. Sergio Álvarez Armijo  
Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago - Chile**

**2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría dedicar estas palabras a mis tutores de tesis: la Dra. Denisse Bravo y el Dr. Andrew Quest, por darme la oportunidad de trabajar con ellos, apoyarme en todo momento, por la confianza depositada en mí y la paciencia durante todo el desarrollo de mi tesis. De ellos aprendí que la constancia y perseverancia te lleva lejos.

También a la Dra. Marcela Hernández, por proveernos del kit necesario para medir las citoquinas, y al Dr. Rolando Vernal, por prestarnos sus equipos en el desarrollo de la tesis.

El proceso de hacer una tesis en el ámbito científico a veces puede ser duro, frustrante y solitario, por esto es que le quiero agradecer infinitamente a cada una de las personas del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología por hacerme sentir como si estuviera en casa; por las risas, la compañía, los tecitos, las galletas y todos los consejos para la vida que me dieron: a Darna, por siempre estar atenta a lo que necesitara y su preocupación hacía mí; a Daniela, por ser como mi hermana mayor; a Carmen, por todas esas veces que me espero para que no regresara sola; a Carla, por toda la ayuda que me brindó y hacerme parte de su familia; a Cris, por tener siempre una sonrisa para mí y por todo el apoyo moral que me brindó y a Berny, por siempre estar disponible para mí, su humor y simpatía. Espero poder devolver algún día todo el cariño que me han dado.

También quiero agradecer a la gente del Laboratorio de Comunicaciones Celulares por siempre tenderme una mano amiga, enseñarme, cuidarme, regalarme parte de su tiempo sin esperar nada cambio, en especial a Lorena, a quien veo como una hermana; a Sam, por ayudarme tantas veces con mis experimentos, incluso dejando de lado los suyos y sobre todo a Natalia, porque a pesar de haberse ido lejos siempre estuvo dispuesta a cooperar con lo que fuese.

A mis amigos de la Universidad: Magda, Francia, Fernando, Camilo, Gaby, Jessa, Chang y Manuel por todos los momentos lindos y no tan lindos que pasamos, por soportarme en mis minutos de estrés, por reírse de mis locuras y por ser parte de mis triunfos y mis derrotas. Infinitas gracias, porque me han demostrado que a pesar de estar en un ambiente tan competitivo sí se puede hacer grandes amigos.

A mi familia, en especial a mi mamá que lo ha dado todo por mí, ya que a su manera, nunca dejó que me rindiera y me motivó a seguir hasta el final. A mi papá, hermanos y abuelos, por su comprensión cada vez que no podía pasar tanto tiempo con ellos. A todas esas personas que colaboraron con mis estudios; al señor Francisco Jarpa, por estar presente a lo largo de toda mi carrera velando porque no me faltara nada.

**¡Muchísimas gracias a todos!**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología Oral, de la Facultad de Odontología y en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares, ambos pertenecientes Universidad de Chile. Fue financiado por los proyectos CONICYT-FONDAP 15130011, Fondecyt 1170925 del Dr. Andrew Frederick Geoffery Quest y FIOUCH 17/020 de la Dra. Denisse Bravo Rodríguez.

## ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Periodontitis.....	1
1.2 Etiología de la enfermedad periodontal.....	1
1.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	4
1.4 Lipopolisacárido de <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	7
1.5 El lipopolisacárido de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y la activación de receptores tipo Toll.....	9
1.6 Activación de TLRs, citoquinas y migración celular.....	11
<b>2. Hipótesis.....</b>	<b>13</b>

<b>3. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
<b>4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>15</b>
4.1 Instrumentos y equipos.....	15
4.2 Materiales y reactivos.....	15
4.3 Cepas bacterianas.....	16
4.4 Cultivo celular.....	17
4.4.1 Condiciones de cultivo celular.....	17
4.5 Protocolo de infección de células OKF6/TERT2 con <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	18
4.6 Citometría de flujo.....	19
4.7 Ensayo Múltiple Luminex.....	19
4.8 Ensayo de trans migración en cámara de Boyden.....	20
4.9 Obtención de extractos proteicos y Western Blot.....	21
4.10 Análisis Estadístico.....	22
<b>5. Resultados.....</b>	<b>23</b>

5.1 El antígeno O de <i>Porphyromonas gingivalis</i> no contribuye a modificar los niveles de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2.....	23
5.2 El antígeno O de <i>Porphyromonas gingivalis</i> contribuye a disminuir los niveles de IL-8 de manera independiente de TLR4.....	26
5.3 El antígeno O de <i>Porphyromonas gingivalis</i> favorece un fenotipo migratorio en las células OKF6/TERT2 que se potencia por el bloqueo de TLR4.....	29
<b>6. Discusión.....</b>	<b>35</b>
6.1 La presencia del antígeno O de <i>Porphyromonas gingivalis</i> no contribuye a aumentar los niveles de TLR4 en la superficie celular.....	35
6.2 La presencia del antígeno O de <i>Porphyromonas gingivalis</i> disminuye los niveles de IL-8, de manera independiente de TLR4.....	37
6.3 La presencia del antígeno O de <i>Porphyromonas gingivalis</i> contribuye a aumentar la migración de las células OKF6/TERT2.....	40
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>8. Referencias.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparación entre salud periodontal, gingivitis y periodontitis.....	2
<b>Figura 2.</b> Diagrama de invasión de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a células epiteliales de arteria coronaria humana.....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura general del Lipolisacárido (LPS).....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema de hipótesis.....	13
<b>Figura 5.</b> Niveles de TLR4 y TLR2 en la superficie de células OKF6/TERT2 luego de ser infectadas con diferentes cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por 24 horas.....	25
<b>Figura 6.</b> Niveles de citoquinas pro-inflamatorias liberadas por las células OKF6/TERT2 luego de ser infectadas con diferentes cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por 24 horas.....	28
<b>Figura 7.</b> Células OKF6/TERT2 que migraron luego de ser infectadas con diferentes cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Niveles de Caveolina-1 en las células OKF6/TERT2 luego de ser infectadas por 2,4, 8 y 24 horas con diferentes cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	34

## **ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AgO</b>	Antígeno O
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>APS</b>	Amonio Persulfato
<b>ATCC</b>	Colección Americana de Cultivos Tipo
<b>BCA</b>	Ácido Bicinconínico
<b>BHI</b>	Infusión Corazón-Cerebro
<b>CAV1</b>	Caveolina-1
<b>CD14</b>	Cluster de Diferenciación 14
<b>CD282</b>	Cluster de Diferenciación 282 (Denominación que recibe TLR2)
<b>CD284</b>	Cluster de diferenciación 284 (Denominación que recibe TLR4)
<b>EDTA</b>	Ácido Etildiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidermal
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
<b>FACS</b>	Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia
<b>GECS</b>	Células epiteliales gingivales
<b>HRPO</b>	Enzima Peroxidasa de Rábano
<b>IL-6</b>	Interlequina 6
<b>IL-8</b>	Interlequina 8
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interlequina 1 beta
<b>Kgp</b>	Lisina-gingipaína
<b>KSFM</b>	Medio de Crecimiento de Queratinocitos Libre de Sueros

<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MD2</b>	Antígeno linfocitario 96
<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salinos
<b>PMSF</b>	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
<b>RANK-L</b>	Receptor activador del factor nuclear kappa B
<b>Rgp</b>	Arginina-gingipaina
<b>RPM</b>	Revoluciones por Minuto
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de Sodio
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TEMED</b>	Trimetiletilendiamina
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>TLR1</b>	Receptor tipo <i>Toll</i> 1
<b>TLR2</b>	Receptor tipo <i>Toll</i> 2
<b>TLR4</b>	Receptor tipo <i>Toll</i> 4
<b>TLR6</b>	Receptor tipo <i>Toll</i> 6
<b>TNF-α</b>	Factor Necrótico Tumoral alfa

## RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de las estructuras que soportan las piezas dentales, la cual está asociada a un proceso infeccioso causado por un cambio en la ecología local de la biopelícula bacteriana oral. Un 90% de la población chilena presenta signos clínicos de esta patología. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) se ha propuesto como un agente etiológico clave en la periodontitis. En nuestro laboratorio, se obtuvieron aislados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de individuos sanos, en los que se vio ausencia de la región del antígeno O (AgO) del lipopolisacárido (LPS). En cambio, en aislados clínicos provenientes de pacientes con periodontitis, el LPS está completo. Además, se ha observado anteriormente que cuando células de epitelio gingival (GECs, por sus siglas en inglés) eran infectadas con una cepa silvestre de *P. gingivalis* (W50) había un aumento del ARNm del Toll-like receptor 4 (TLR4), a diferencia de lo que ocurre cuando son infectadas con una mutante isogénica carente de AgO polimérico (cepa  $\Delta PG1051$ ), sugiriendo que el AgO sería importante para el reconocimiento de la bacteria.

Una de las consecuencias de la activación de TLRs es el incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Esto se ha relacionado con un aumento en la capacidad migratoria en varios tipos celulares, incluyendo a GECs, donde la migración favorece la formación de saco periodontal.

Considerando estos antecedentes, el objetivo que se planteó fue determinar si la activación de TLR4 mediada por el AgO es capaz de aumentar los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de promover la migración en células OKF6/TERT2. Para ello se midió el nivel de TLR4 (citometría de flujo), TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  (multiplex) y migración (cámara de Boyden) luego de infectar con las cepas anteriormente mencionadas. Nuestros resultados muestran que la infección con *P. gingivalis* no cambia los niveles de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2, independiente de la presencia o ausencia de AgO. Por otra parte, los niveles de IL-8 disminuyeron sólo con la cepa virulenta de *P. gingivalis* W50, a diferencia de la mutante isogénica en el LPS que no produce AgO, que no los cambia. Estos cambios son independientes de TLR4. Finalmente, la cepa con un LPS completo (W50) produce un aumento de la migración. Sin embargo, en ausencia de AgO no hay cambios significativos con respecto a las células no infectadas.

En conclusión, en este trabajo comprobamos que el AgO de *P. gingivalis* participa en la modulación de los niveles marcadores pro-inflamatorios (IL-8) y migración celular, lo cual podría contribuir al desarrollo de la periodontitis.

## ABSTRACT

Periodontitis is a highly prevalent chronic inflammatory disease in Chile and worldwide that mainly affects the tissues supporting de teeth. This disease is associated with an infectious process caused by a change in the local ecology of the subgingival biofilm. It has been proposed that the bacterium *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) plays a key role in disease onset and progression because this bacterium induces dysbiosis that contributes to the inflammatory process. In a previous study from our group, we observed that the O antigen (OAg) region of the lipopolysaccharide contributes to the inhibition of apoptosis induced by *P. gingivalis* in epithelial cells, which correlates with an increase in the expression of TLR4.

One of the consequences of the activation of TLRs is the increase in the levels of pro-inflammatory cytokines. This has been related to an increase in the migratory capacity of several cell types, including human oral epithelial cells, where enhanced migration is associated with formation of periodontal pockets. Considering this background, the objective was to determine if TLR4 activation mediated by AgO can increase the levels of pro-inflammatory cytokines and to promote migration an oral epithelial cell line OKF6 / TERT2. For this, the level of TLR4 (flow cytometry), TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1 $\beta$  (multiplex) and migration (Boyden's chamber) were measured after infecting with the previously mentioned strains. Our results show that infection with *P. gingivalis* does not

change the TLR4 levels on the surface of OKF6 / TERT2 cells, independent of the presence or absence of AgO. On the other hand, levels of IL-8 decreased only with the virulent strain of *P. gingivalis* W50, unlike the isogenic mutant in LPS that does not produce AgO, which does not change them. These changes are independent of TLR4. Finally, the strain with a complete LPS (W50) produces an increase in migration. However, in the absence of AgO there are not significant changes with respect to uninfected cells.

In conclusion, in this work we found that the AgO of *P. gingivalis* participates in the modulation of pro-inflammatory marker levels (IL-8) and cell migration, which could contribute to the development of periodontitis.

## **1. INTRODUCCIÓN**

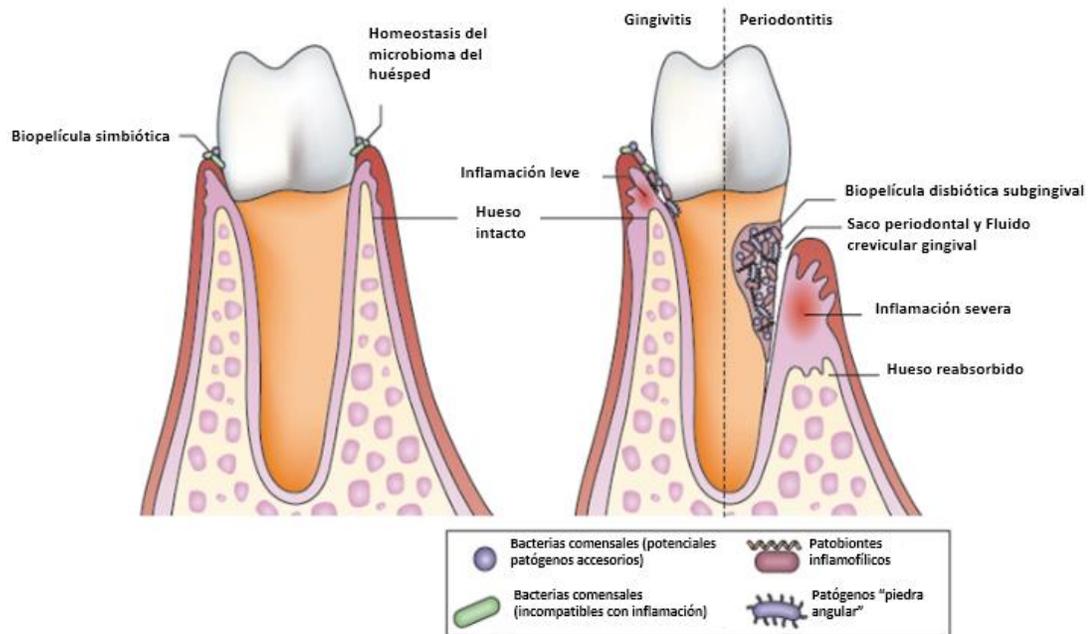
### **1.1 Periodontitis**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de las estructuras que soportan las piezas dentales. Provoca una pérdida gradual de los tejidos periodontales; incluyendo hueso periodontal, y en casos severos (5-10%) la pérdida del diente (1) (Figura 1). La periodontitis crónica es una de las patologías inflamatorias más prevalentes en seres humanos y constituye un gran problema de salud a nivel mundial, afectando entre un 30-50% de la población adulta. En Chile, se ha reportado que al menos un 90% de la población adulta padecería algún grado de esta enfermedad (2). Los principales factores de riesgo asociados a periodontitis son: edad, género, raza, nivel educacional, nivel socioeconómico, tabaquismo, factores genéticos, la presencia de algunas enfermedades, entre ellas diabetes, osteoporosis y enfermedades sistémicas asociadas con déficit o disfunción de los neutrófilos (3,4).

### **1.2 Etiología de la Enfermedad Periodontal**

Esta patología se gatilla en respuesta a la microbiota periodontal disbiótica que se acumula como placa bacteriana en la superficie del diente, debajo de la línea de las encías, produciendo como consecuencia una reacción inflamatoria crónica (5). Las bacterias disbióticas, también llamadas patobiontes, son microorganismos comensales que en condiciones de alteración de la

homeostasis tienen el potencial de desregular la respuesta inflamatoria y causar enfermedad (6). Se caracterizan por ser del tipo Gram negativo, a diferencia de las primeras bacterias que forman la biopelícula y que se relacionan a un estado de salud, las cuales son principalmente Gram positivo (7).



**Figura 1. Comparación entre salud periodontal, gingivitis y periodontitis.** La imagen de la izquierda muestra una encía sana en presencia de una biopelícula simbiótica, con un hueso intacto. La imagen de la derecha, por una parte, muestra los cambios que ocurren cuando hay gingivitis; un aumento de bacterias que colonizan el espacio entre el diente y la encía y una leve inflamación de esta. Por otra parte, en un contexto de periodontitis existe una inflamación severa producto del aumento de bacterias que ahora colonizan la zona subgingival. Esta inflamación crónica, puede conducir la resorción del hueso. Modificado de Hajishengallis G, 2015 (8).

Estos patógenos tienen la capacidad de secretar vesículas que contienen proteasas y endotoxinas que aumentan la excreción de mediadores pro-inflamatorios como prostaglandina E2; tromboxano E2; interleuquinas 1, 6, 8, 17; factor de necrosis tumoral y colagenasas (9). A su vez, pueden estimular la producción de metaloproteinasas, lo que finalmente lleva a la resorción del hueso (9). La existencia de una inflamación constante o crónica se ha asociado a un incremento del riesgo de la transformación maligna de las células epiteliales afectadas (10). Además, se ha relacionado a otras enfermedades como diabetes mellitus (11), enfermedades cardiovasculares (11), osteoporosis (12), psoriasis (13), y además a diversos tipos de cáncer, destacando los cánceres: oral (14), gastrointestinal superior (15), pulmón (16) y páncreas (17).

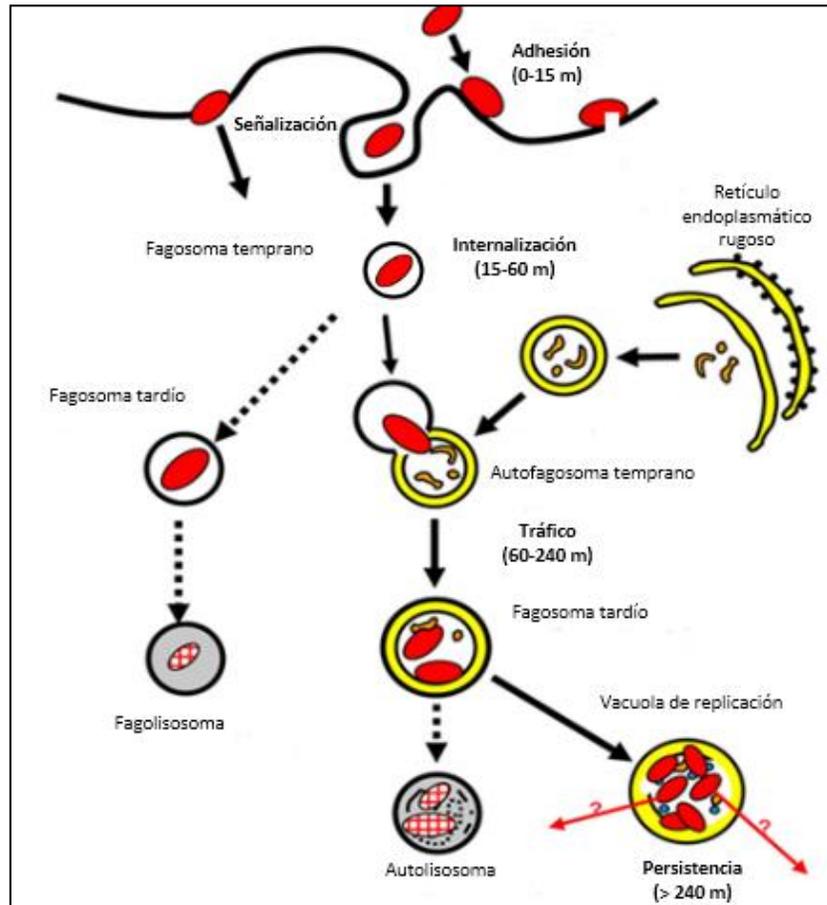
La observación y análisis de la inflamación gingival ha permitido identificar a más de 700 especies bacterianas (18). Dentro de ellas, existe un complejo bacteriano llamado “complejo rojo”, compuesto por *Treponema dentícola* (*T. dendícola*), *Tanerella forsythia* (*T. forsythia*) y *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), que ha sido asociado fuertemente al avance de las lesiones periodontales (19). Si bien esta última se encuentra en poca cantidad en la placa bacteriana subgingival, sería la “piedra angular” del proceso de infección, ya que actúa remodelando la microbiota comensal a través de procesos disbióticos que alteran el balance homeostático con las células epiteliales, lo que lleva a la inflamación destructiva en la periodontitis (20). Además, *P. gingivalis* es la bacteria aislada con mayor frecuencia desde

pacientes con periodontitis crónica (21). Sin embargo, los mecanismos por los cuales podría estar actuando aún no está completamente esclarecidos y muchos de ellos son objeto de debate.

### **1.3 *Porphyromonas gingivalis***

*P. gingivalis* es una bacteria anaerobia estricta Gram negativa, cuyas colonias cultivadas en agar sangre suplementado con hemina y menadiona se observan de color negro (22). Esta bacteria está en estrecho contacto con Células Epiteliales Gingivales (GECs en inglés), ubicándose en sacos periodontales *in vivo* (23) y tiene la capacidad de invadir diferentes tipos celulares, incluyendo células epiteliales (24, 25, 26), células endoteliales (27) y fibroblastos (28). El proceso de invasión es una propiedad importante en la virulencia de *P. gingivalis*. Éste comienza con la adhesión de la bacteria a la superficie de la célula epitelial. Una vez adherida, se internaliza y termina incorporándose a fagosomas tempranos. Allí, la bacteria activa el proceso de la autofagia, usándolo en su beneficio (29). El proceso de autofagia es aquel en el que parte del citoplasma y organelos son secuestrados dentro de vacuolas autofágicas de doble o multi-membrana llamadas autofagosomas, y finalmente son entregadas a los lisosomas para su degradación (30). Cuando *P. gingivalis* se localiza dentro del autofagosoma tardío impide la fusión de éste al lisosoma, manteniéndose en esta “vesícula persistente” (29) (Figura 2). Es importante hacer notar que estas vesículas son ideales para la continuidad de *P. gingivalis*

intracelularmente, ya que las vesículas aún se encuentran etiquetadas como autofagosomas. Por lo tanto, la célula hospedera seguirá entregándole proteínas y la bacteria puede aprovecharlas como fuente de péptidos y aminoácidos para su supervivencia (31). Sin embargo, antecedentes de la literatura indican que este proceso está determinado por la multiplicidad de infección (MOI) con que se infectan las células. Por ejemplo, a una MOI de 100 la bacteria se internaliza y su tráfico es vía autofagia. Pero, a una MOI de 1000 la mayoría de ellas van por la vía fagocítica (32). Es decir, sólo en el primer caso la bacteria puede mantenerse oculta, ya que cuando hay una gran cantidad, el sistema inmune reacciona y la elimina.



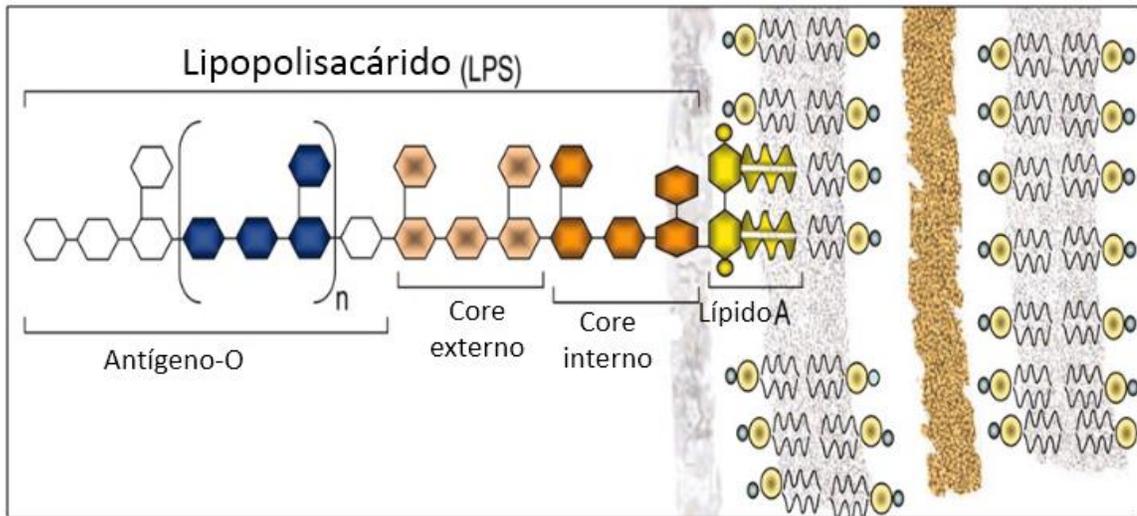
**Figura 2. Diagrama de la invasión de *P. gingivalis* a células epiteliales de arteria coronaria humana.** Se muestra la entrada propuesta, el tráfico y la persistencia de la cepa de *P. gingivalis* que utiliza la vía de la autofagia. Modificado de Olsen y Progulske-Fox, 2015 (31).

La habilidad de *P. gingivalis* de producir periodontitis está determinada por su arsenal de factores de virulencia, entre los cuales están: dipeptidil transferasa bacteriana IV, que en conjunto con la formación de biopelículas contribuye al potencial patogénico de la bacteria; proteasas conocidas como gingipaínas que ayudan a la captación de hierro, además de ayudar con el procesamiento de varias proteínas de superficie como fimbrias, hemaglutininas

y el receptor de hemoglobina, lo cual ayuda a la bacteria en la colonización e invasión del líquido crevicular; y moléculas de membrana como el lipopolisacárido (LPS) mediante el cual las células epiteliales gingivales pueden interactuar directamente con la bacteria y sus productos en las lesiones causadas por la periodontitis (33). Además, el LPS induce citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, las que a su vez conducen a la destrucción del tejido periodontal (34).

#### **1.4 Lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis***

El LPS es una molécula glicolípida presente en la membrana de las bacterias Gram negativo. Se considera como el antígeno de superficie más importante de estas bacterias, ya que constituye un 75% de la superficie bacteriana (35). Esta molécula está formada por tres segmentos bien definidos: el lípido A hidrofóbico unido a la parte más externa de la membrana, un polisacárido-O (antígeno O (AgO)) altamente variable y un Core de oligosacáridos que une el lípido A con el AgO formando el “centro bioactivo” del LPS, responsable de la endotoxicidad (36) (Figura 3). La actividad biológica del LPS depende de dos grandes factores: primero, de su capacidad de formar agregados cuando se encuentra en un medio acuoso y existe la concentración micelar crítica adecuada (37).



**Figura 3. Estructura general del Lipopolisacárido (LPS).** Se observan las diferentes regiones del LPS, su lípido A anclado a la membrana externa de la bacteria, el Core de oligosacáridos (dividido en el Core interno y externo) y el antígeno O. Modificado de Dixon y Darveau, 2005 (38).

El segundo factor es que, a diferencia de los LPS de otras bacterias, como *Escherichia coli* (*E. coli*) por ejemplo, el LPS de *P. gingivalis* contiene una cantidad inusual de modificaciones del lípido A que le otorgan cierta heterogeneidad, lo que hace difícil la interpretación de la respuesta del sistema inmune gatillada por esta bacteria o por preparados de su LPS (39). Además, esta característica ha generado gran debate con respecto a los receptores de superficie y las vías de transducción de señales involucradas en la interacción entre la célula hospedera y el LPS de *P. gingivalis*, puesto que la bacteria tiene la inusual capacidad de interactuar tanto con receptores tipo Toll 2 (TLR2) y receptores tipo Toll 4 (TLR4) (36).

## **1.5 El lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* y la activación de receptores tipo Toll**

Los receptores tipo Toll (TLRs en inglés) son proteínas transmembrana tipo I que se caracterizan por poseer un dominio extracelular rico en leucina y una cola citoplasmática conocida como dominio Toll/IL-1R (TIR). Reconocen diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs en inglés) de bacterias, hongos, parásitos y virus, incluidos componentes basados en lípidos bacterianos de la pared celular tales como el LPS y lipopéptidos, componentes de proteína microbiana, como la flagelina, y ácidos nucleicos tales como ARN y ADN CpG de hebra simple o doble hebra (40). Dependiendo de la composición de PAMPs, los TLRs pueden agruparse en aquellos que se encuentran en la membrana celular y los que están en membranas endosomales (41). Tanto TLR4 como TLR2 se encuentran ubicados en la membrana celular. TLR4 principalmente se encarga de reconocer el LPS de bacterias Gram negativo y TLR2, en conjunto con TLR1 o TLR6 reconoce lipopéptidos triacilos o diacilos, respectivamente (42). Estudios realizados con el LPS de *P. gingivalis* en ratones deficientes de TLR4 mostraron, en un principio, que hay una cierta actividad atribuible a TLR2 (43). Sin embargo, estos resultados fueron descartados por la posible contaminación con lipoproteínas (44). Por otro lado, las modificaciones en el lípido A, específicamente si este se encuentra tetra o penta-acilado han demostrado que pueden activar de manera diferencial a

TLR4 y TLR2 (36). En la mayoría de los estudios, el LPS es adquirido de manera comercial o purificado de una cepa de referencia.

Con el fin de tener una aproximación más real de lo que sucede con el LPS de *P. gingivalis* en el contexto de periodontitis, en nuestro laboratorio se compararon los perfiles del LPS de cepas de *P. gingivalis* de pacientes con periodontitis crónica con los de individuos sanos, mostrando que en estos últimos había ausencia de moléculas de AgO de alto peso molecular (45). Trabajos de Soto y cols 2015 (46), evaluaron de qué forma esto podía influir en la activación de TLRs. Para esto utilizaron 3 cepas diferentes de la bacteria: la cepa silvestre W50 (posee un LPS completo); una mutante isogénica de W50 ( $\Delta$ PG1051), la cual ha perdido completamente el AgO y la respectiva cepa complementada ( $C\Delta$ PG1051). Estas cepas se utilizaron para infectar la línea celular OKF6/TERT2 (47), que corresponde a queratinocito orales humanos inmortalizados. Analizando los niveles de expresión de TLR2 y de TLR4, se observó un aumento de la expresión de ARNm de TLR2 en estas células infectadas con las tres cepas utilizadas y de TLR4 en las células infectadas con las cepas W50 y  $C\Delta$ PG1051 (46). Esto indica, en primer lugar, que estas células expresan TLR2 y TLR4 y que la activación de TLR2 no estaría afectada por la ausencia de AgO. Además, se demostró que cuando estas células son infectadas con cepas de *P. gingivalis* que poseen un LPS completo aumentan su viabilidad celular y proliferación producto de la disminución de la apoptosis, sugiriendo que el AgO podría estar participando en estos procesos y que

estarían relacionado con la activación de TLR4 en estas células (48). Estos procesos son claves en la persistencia de la bacteria en la célula, puesto que le ayudan a mantenerse en el tiempo y de esta manera producir los efectos crónicos propios de la enfermedad.

### **1.6 Activación de TLRs, citoquinas y migración celular**

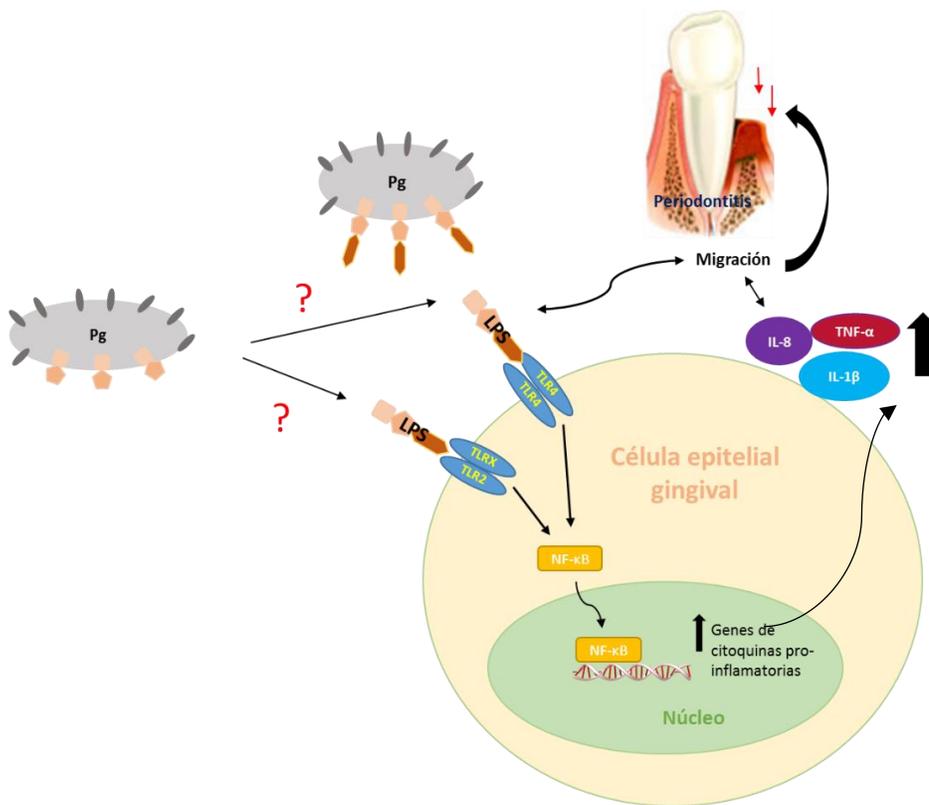
Otro efecto importante al que contribuye *P. gingivalis* es a aumentar la profundidad del surco gingival (> 3mm), culminado con la formación del saco periodontal. Este es el cambio clínico y patológico más importante asociado con inflamación en periodontitis (49). La presencia de este espacio se produce debido a la migración apical del epitelio de unión como consecuencia de la acumulación de microorganismos en la superficie dental (49). A la fecha, no existen estudios que relacionen directamente la activación de TLR4 con la capacidad de promover migración en GECs, ni tampoco que demuestren que exista algún factor de virulencia específico que lo haga. Sin embargo, trabajos realizados en células musculares vasculares lisas muestran la capacidad del LPS de activar la vía TLR4/Rac-1/Akt. Paralelamente, este efecto sobre Akt se ve potenciado por la señalización río abajo de TLR4, la cual promueve la activación de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) (50), una proteína de la que se sabe está involucrada en el proceso de migración celular (51). Además, también se ha visto que Rac-1 participa favoreciendo el fenotipo migratorio en varios tipos celulares (52, 53). Por otra parte, se sabe que la activación de TLR4 por el

LPS bacteriano produce un aumento de citoquinas pro-inflamatorias. Por ejemplo, la presencia de IL-8 en el líquido crevicular y en el epitelio gingival está correlacionada con la severidad de la enfermedad (54). Esta interleuquina puede actuar sobre células epiteliales o endoteliales y promover migración, proliferación y angiogénesis *in vivo* durante la respuesta inflamatoria que se gatilla en enfermedades infecciosas (55). Otros estudios realizados en el contexto de cáncer gástrico muestran un incremento de la expresión de mediadores pro-inflamatorios; IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que a la vez se relaciona con un aumento de la migración en las células de cáncer gástrico humano luego de ser co-cultivadas con una línea celular correspondiente a neutrófilos (56).

Resumiendo, el LPS de *P. gingivalis* juega un rol importante en el contexto inflamatorio y por ende, en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Específicamente, uno de sus componentes, el AgO, parece ser necesario para el reconocimiento por TLR4, no así por TLR2. Sin embargo, no existen trabajos que evalúen el rol del AgO sobre la activación de este TLR y que lo asocien directamente al aumento de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo de células epiteliales orales. Además, el hecho de que se haya encontrado un AgO defectuoso en individuos periodontalmente sanos podría indicar que tiene alguna función en la promoción del fenotipo migratorio en estas células.

## 2. HIPÓTESIS

La activación de TLR4 mediado por el antígeno O de *Porphyromonas gingivalis* eleva los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y aumenta la migración de células OKF6/TERT2 (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de hipótesis.** El LPS de *P. gingivalis* es reconocido por TLR4 y TLR2. La activación de este tipo de receptores conduce a la producción de mediadores inflamatorios a través de NF-κB. El aumento de los niveles de citoquinas como IL-8, TNF-α e IL-1β contribuye a la progresión de la periodontitis. Esta cascada de señalización se ha relacionado con un aumento del fenotipo migratorio, lo que a su vez favorece la formación de bolsas periodontales y la retracción de las encías. Sin embargo, el rol que jugaría el AgO de *P. gingivalis* aún no ha sido evaluado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto del antígeno O sobre la activación de TLR4 y relacionarlo con el aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de la migración de células OKF6/TERT2

#### **3.2 Objetivos específicos**

**3.2.1** Determinar los niveles de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2 infectadas con las cepas W50,  $\Delta PG1051$  y  $C\Delta PG1051$  de *Porphyromonas gingivalis*.

**3.2.2** Medir los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-8 en células OKF6/TERT2 infectadas con las cepas W50,  $\Delta PG1051$  y  $C\Delta PG1051$  de *Porphyromonas gingivalis* y evaluar la participación de TLR4.

**3.2.3** Medir la migración de las células OKF6/TERT2 infectadas con las cepas W50,  $\Delta PG1051$  y  $C\Delta PG1051$  de *Porphyromonas gingivalis* y evaluar la participación de TLR4.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Instrumentos y equipos**

Los instrumentos y equipos usados para realizar los experimentos, mantener células y cepas bacterianas fueron: gabinete de seguridad biológica Nuaire LabGard ES425; incubador de CO<sub>2</sub> Nuaire Autoflow 8500; incubador de CO<sub>2</sub> LabTech LCO-265AI; baño termostático Memmert WNB7; microscopio invertido Zeiss Primo Vert; cámara de Neubauer Marienfeld; centrífuga Eppendorf 5417R; centrífuga Hettich Rotina 35R; espectrofotómetro Dynamica Halo RB-10; equipo de electroforesis Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell; fuente de poder Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply; lector de placas BioTek ELx800; equipo Luminex MAGPIX® de Luminex Corporation

### **4.2 Materiales y reactivos**

Jarras de anaerobiosis, AnaeroGen e Infusión Cerebro-Corazón (BHI) de Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hants., Inglaterra); gentamicina de US biological (Salem, MA, EEUU); Cámara de anaerobiosis Bactron300 Shel Lab, tripsina-EDTA de Hyclone (Logan, UT, EEUU); medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero (KSFM), pituitaria de bovino, factor de crecimiento epidermal y tampón fosfato salino (PBS) de Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU); hemina de Calbiochem (San Diego, CA, EEUU); placas de cultivo de 100 mm, placas de cultivo de 6, 24 y 96 pocillos y pipetas serológicas de BD Falcon™ (Franklin Lakes, NJ, EEUU); menadiona, mowiol 4-88, metronidazol, anticuerpo policlonal

anti  $\beta$ -Actina de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EEUU); Tris, amonio persulfato (APS), Azul Tripán, TEMED y dodecilsulfato de sodio (SDS) de Winkler Ltda. (Santiago, Chile); penicilina-estreptomicina, EZ-ECL de Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltda. (Kibbutz Beit-Haemek, Israel); los reactivos para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EEUU); anti-cuerpo policlonal anti-caveolina-1 de BD Transduction Laboratories™ (San Diego, CA, EEUU); anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplados a la enzima peroxidasa de rábano (HRPO) de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU); Human Premixed Multi-analyte kit de R&D Systems (Minneapolis, MN, EEUU).

#### **4.3 Cepas bacterianas**

Las cepas utilizadas fueron: cepa de referencia de *P. gingivalis*: W50 (ATCC 53978), cepa mutante isogénica de *P. gingivalis*, generada por intercambio alélico en el gen de la ligasa del antígeno O  $\Delta PG1051$  y cepa complementada en cis con el plasmidio pSN1  $C\Delta PG1051$  (57). Estas cepas fueron obtenidas gracias a la donación del Dr. Joe Aduse Opoku, Centro de Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Instituto Blizard, Reino Unido.

#### **4.4 Cultivo celular**

Se utilizó la línea de células de epitelio gingival OKF6/TERT2 (47), facilitada por la Dra. Anna Donari-Bagtzoglou, Escuela de Medicina Dental, Universidad de Connecticut, EEUU.

##### **4.4.1 Condiciones de cultivo celular**

Las células OKF6/TERT2 fueron cultivadas en medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero (KSFM) suplementado con extracto de pituitaria de bovino 25 µg/mL, factor de crecimiento epidermal (EGF) 0,2 ng/mL, cloruro de calcio 0,3 M y penicilina/estreptomina, a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> ambiental.

Las células se mantuvieron entre 40 a 80% de confluencia. Para realizar pasaje celular (caso 1) o generar una monocapa para los ensayos de infección (caso 2), las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 2-3 veces y se agregó 1 mL de tripsina-EDTA, incubando por 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 5 mL de PBS para diluir la tripsina y las células fueron soltadas de la placa mediante pipeteo o utilizando un raspador para células. Esta suspensión fue recuperada y centrifugada a 2400 rpm por 10 min. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 1 mL de medio completo en el caso 1 y sin antibióticos para el caso 2. Finalmente, se tomó una alícuota de 10 µL y se mezcló con 10 µL de Azul Tripán y 80 µL de medio. De esta mezcla se tomaron 10 µL y se realizó el conteo células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido.

#### **4.5 Protocolo de infección de células OKF6/TERT2 con *P. gingivalis***

Se sembraron  $10^6$  células por condición en placa de 10 cm para los ensayos de citometría de flujo y migración,  $8 \times 10^5$  células por condición en placa de 6 pocillos para medir niveles de proteínas por y  $2 \times 10^5$  células por condición en placa de 24 pocillos para medir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, y se mantuvieron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Las cepas W50,  $\Delta$ PG1051 y  $\Delta$ CPG1051 fueron sembradas en caldo BHI suplementado con hemina y menadiona y crecidas por 24 horas en anaerobiosis. Posteriormente, se midió la densidad óptica de los caldos de cultivo a 560 nm, mediante un espectrofotómetro. Los caldos fueron centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos para eliminar el sobrenadante. El pellet de bacterias fue resuspendido en PBS. La MOI 100 fue calculada en base a las densidades ópticas obtenidas y las células OKF6/TERT2 fueron infectadas durante 90 min a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas con PBS 3 veces y se les agregó medio celular suplementado con gentamicina 300 µg/mL y metronidazol 200 µg/mL. Al agregar antibióticos podemos eliminar las bacterias que no hayan ingresado a la célula. Este tiempo se considera como el "tiempo 0" y los tiempos post-infección se consideran a partir de este punto.

#### **4.6 Citometría de flujo**

Para determinar los niveles de expresión de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2 se sembraron  $10^6$  células por condición en placa de 10 cm y fueron infectadas por 24 horas con las distintas cepas de *P. gingivalis*, como se describió en el punto 4.5. Luego, se recolectaron usando una solución EDTA 25 mM y se lavaron una vez con PBS. A continuación, fueron incubadas por 30 minutos con una solución de PBS + 10% Suero Fetal Bovino (PBS/SFB), de manera de poder bloquear los sitios de unión inespecífica. En seguida, se incubaron en oscuridad durante 1 hora usando el anticuerpo anti-TLR4-PE/Cy7 o el anticuerpo Alexa Fluor 647 anti-human CD282 TLR2, ambos diluidos en PBS/SFB y se lavaron 2 veces con PBS FACS. Las células fueron llevadas al citómetro FACSort (Becton Dickinson) Los análisis se realizaron con al menos 10.000 eventos y se cuantificó la media de fluorescencia que da cuenta de la cantidad de TLR4 en la superficie.

#### **4.7 Ensayo Múltiplex Luminex**

Para medir los niveles de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  secretados por las células OKF6/TERT2, se sembraron  $2 \times 10^5$  células por condición en placa de 24 pocillos y fueron infectadas por 24 horas con las distintas cepas de *P. gingivalis*, como se describió en el punto 4.5. Luego del término del tiempo post-infección, los sobrenadantes de cada condición fueron recuperados. Posteriormente las muestras fueron tratadas usando el Human Premixed Multi-Analyte kit, de

acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las lecturas fueron realizadas utilizando el equipo Luminex MAGPIX®.

#### **4.8 Ensayo de trans migración en cámara de Boyden**

Para evaluar la capacidad migratoria de las células OKF6/TERT2, se sembraron  $1 \times 10^6$  células por condición y se infectaron con las diferentes cepas de *P. gingivalis*, como se describió en el punto 4.5. Los ensayos fueron realizados en cámaras de Boyden (Transwell™ Costar, 6.5 mm de diámetro, 8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro). Las cámaras fueron pretratadas con 100  $\mu\text{L}$  de fibronectina (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la parte inferior a 4 °C 18 h antes del experimento. Al día siguiente se lavó los insertos con 500  $\mu\text{L}$  de PBS para retirar el exceso de fibronectina y se agregó 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB (estímulo migratorio). Luego de terminar la infección, las células fueron lavadas una vez con PBS y se les agregó 12 gotas de tripsina-EDTA, incubando por 5 min a 37°C. La acción de la tripsina fue detenida con 700  $\mu\text{L}$  de medio completo + 10% SFB. Las células fueron soltadas de la placa mediante pipeteo y la suspensión fue recuperada y centrifugada a 1100 rpm por 10 min. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 1 mL de medio completo sin suero. Se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se mezcló con 10  $\mu\text{L}$  de Azul Tripán y 80  $\mu\text{L}$  de medio. De esta mezcla se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se realizó el conteo células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido. Se calculó el número total de células y se sembraron 2 x

$10^5$  células por condición, depositándolas dentro del inserto. Las células se dejaron migrar durante 2 horas, tiempo después del cual se fijaron y tiñeron sólo las células capaces de migrar con 500  $\mu$ l de una solución de cristal violeta (cristal violeta 0,1 % en metanol 20 %) durante 45 min. Finalmente, los insertos son lavados con agua y el exceso de tinción es retirado, dejando secar durante toda la noche. Se contó el número de células que migraron en 7 campos diferentes utilizando un microscopio óptico con un aumento de 40X.

#### **4.9 Obtención de extractos proteicos y Western Blot**

Para la obtención de los extractos proteicos, las células fueron lavadas una vez con PBS frío. Luego se agregó 1 mL de PBS frío con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, Benzamida 100  $\mu$ g/mL, Antipaina 10  $\mu$ g/mL y Leupeptina 12,5  $\mu$ g/mL). Luego, las células fueron soltadas con ayuda de un raspador de células y se recolectó la suspensión, para ser centrifugada por 2 min a 13200 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue sonificado en tampón (Hepes 0.2 mM Ph 7.4, SDS 10%, Benzamidina 10  $\mu$ g/ml, Leupeptina 1  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM, y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA), utilizando placas de 96 mm y se leyó la absorbancia de las muestras a 562 nm utilizando el equipo ELISA VersaMax (Molecular Device, Sunnyvale, USA). El equivalente de 50  $\mu$ g de proteína total fue desnaturada a 95 °C por 5 min en tampón Laemmli. Las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de

poliacrilamida/SDS al 12%. Después de la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 90 min. Luego la membrana se bloqueó por 1 hora en leche descremada al 5 %, preparada en PBS Tween. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios en agitación durante toda la noche a 4 °C. Después, las membranas fueron se lavadas 3 veces con PBS y se incubaron en agitación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo acoplado a HRPO (1:3000) en PBS-Tween (PBS-T) por 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS y la detección se realizó mediante el sistema EZ-ECL (Biological Industries), en el que la señal es capturada por un sistema de quimioluminiscencia modelo Discovery 12lc de Ultralum (Claremont, CA USA). Las bandas obtenidas en el inmunoblot fueron digitalizadas y analizadas densitométricamente, utilizando el programa ImageJ.

#### **4.10. Análisis Estadístico**

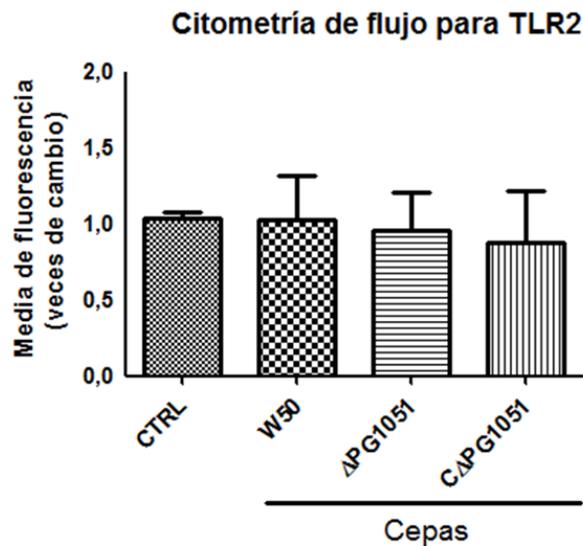
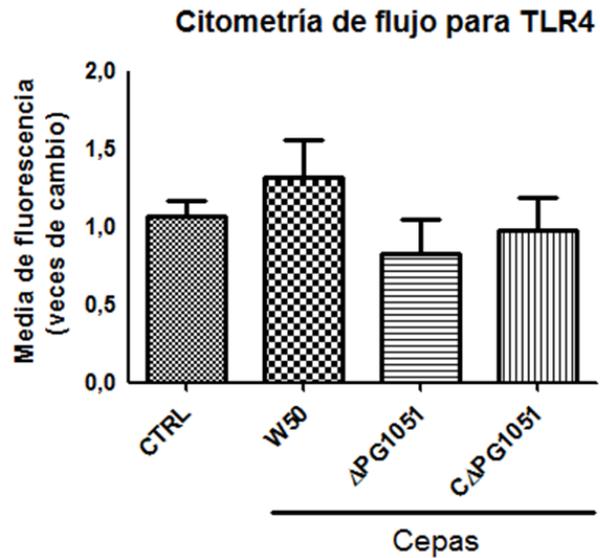
Para el análisis de los datos se utilizó el software GraphPad Prism. La significancia estadística de los datos fue determinada usando el test “one way ANOVA” (ANOVA de una vía) y se comparó las columnas con el control de cada ensayo usando el post-test “Bonferroni”. Para ensayos de 2 variables se utilizó “two way ANOVA” (ANOVA de dos vías) y se compararon las columnas entre ellas mediante el post test “Bonferroni”.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 El antígeno O de *Porphyromonas gingivalis* no contribuye a modificar los niveles de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2

Soto y cols 2015 (46), observaron que el AgO de *P. gingivalis* aumentaba la expresión del ARNm de TLR4, sólo en los casos en que se infectaba con cepas de *P. gingivalis* que poseían AgO. Sin embargo, este efecto no se repetía con el ARNm de TLR2, el cual aumentó de manera independiente de la presencia de AgO. Estos datos sugirieron que el AgO participa del reconocimiento del LPS bacteriano por TLR4 y no por TLR2. Para determinar si este efecto se correlacionaba a nivel proteico, se midieron los niveles de TLR4 por citometría de flujo. Adicionalmente, TLR2 también fue evaluado por esta misma técnica. Para ello se utilizó el anticuerpo PE/Cy7 anti-mouse TLR4 (CD284/MD2 complex); como su nombre lo indica, el epítipo reconocido por este anticuerpo es el que se genera de la unión de TLR4 y el antígeno linfocitario 96, conocido como proteína MD2, cuya unión a TLR4 es crucial para su dimerización y posterior activación de las vías de señalización (58). Por lo tanto, la señal observada dará cuenta de un TLR4 funcional. Para TLR2, se usó el anticuerpo Alexa Fluor 647 anti-human CD282 TLR2. Las células OKF6/TERT2 fueron infectadas como se describió en el punto 4.5 y se analizaron los niveles de TLR4 y TLR2 en la superficie de estas células luego de 24 horas de infección.

Como se observa en la **Figura 5**, los niveles proteicos tanto de TLR4 y TLR2 en la superficie de las células no se ven afectados significativamente con respecto al control, por la infección con la cepa silvestre W50, la mutante *ΔPG1051* o la cepa complementada de *P. gingivalis*. Esto sugiere que el AgO estaría participando en la regulación de TLR4 a nivel de transcrito, pero sin que esto se traduzca en un cambio a nivel de la proteína.



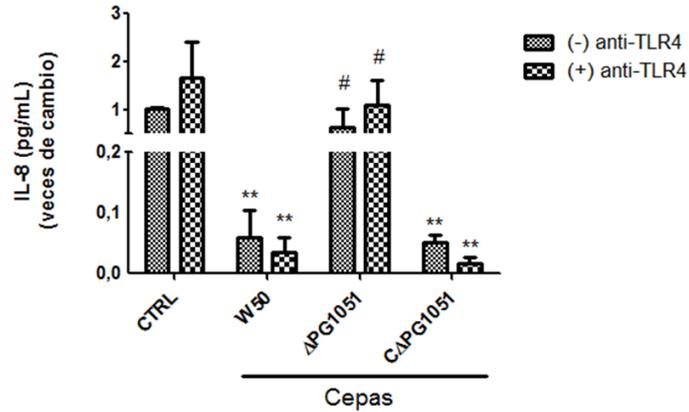
**Figura 5. Los niveles de TLR4 y TLR2 en la superficie de células OKF6/TERT2 no cambian luego de ser infectadas por 24 horas con las cepas de *P. gingivalis*.** La figura muestra las veces de cambio de la media de intensidad de fluorescencia para TLR4 y TLR2, respectivamente. Se asignó arbitrariamente el valor 1,0 para el control correspondiente a células sin infectar. Este ensayo fue realizado con n=3. Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de una vía y posteriormente test Bonferroni.

## **5.2 El antígeno O de *Porphyromonas gingivalis* contribuye a disminuir los niveles de IL-8 de manera independiente de TLR4**

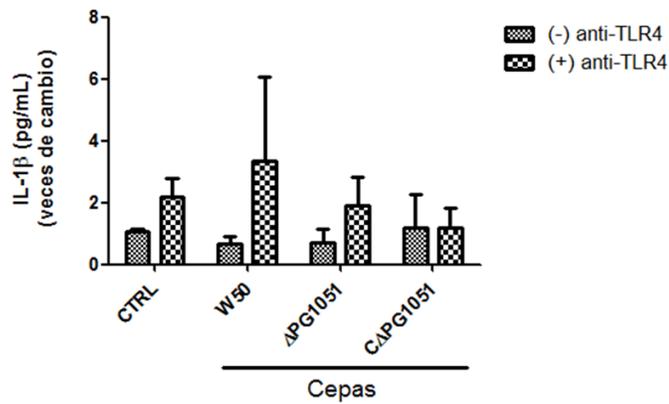
Una de las características más importante de la enfermedad periodontal es el aumento de mediadores pro-inflamatorios como IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y marcadores de destrucción como la metaloproteinasa 8 (59). La inflamación de las encías se traduce en un enrojecimiento o hinchazón de estas que puede ser fácilmente detectado por el paciente y/o un dentista, y puede diferenciarse de una encía sana, ya que esta última posee un color rosado y cubre por completo las raíces de los dientes. Para analizar de qué manera esto se relaciona con la presencia/ausencia del AgO de *P. gingivalis* se realizó un ensayo Multiplex Luminex® en que se midieron los niveles de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Este ensayo consiste en el uso de beads magnéticas marcadas diferencialmente para reconocer múltiples analitos (60). Además, se evaluó la participación de TLR4 en la producción de estas citoquinas. Para ello, TLR4 fue bloqueado usando 0,25  $\mu$ g/mL de PE/Cy7 anti-mouse TLR4 (CD284/MD2 complex), el cual se agregó 1 hora antes, durante y por el tiempo post-infección al medio de las células OKF6/TERT2. El resto de las infecciones fueron realizadas como se describió en el punto 4.5. Una vez culminadas 24 horas post-infección se recuperó el sobrenadante de cada condición y se midió mediante la técnica descrita anteriormente.

Los resultados graficados en la **Figura 6** muestran que IL-8 experimentó una disminución significativa con respecto al control, en los casos en que se infectó con la cepa silvestre W50 o la cepa complementada. Sin embargo, la mutante  $\Delta PG1051$  no logró replicar este efecto. Por otra parte, cuando TLR4 fue bloqueado, no hubo cambios estadísticamente significativos con respecto a cada condición. Se mantuvo el mismo patrón observado sin el bloqueo de TLR4; esto es sólo una disminución estadísticamente significativa infectando con las cepas que poseían AgO. En el caso de IL-1 $\beta$ , la infección con las 3 cepas de *P. gingivalis* no generó cambios significativos con ninguna de las cepas utilizadas, ni tampoco con el uso del anticuerpo que bloqueó TLR4. Los resultados de TNF- $\alpha$  no pudieron ser cuantificados debido a que sus niveles estuvieron bajo el límite de detección del instrumento. Estos hallazgos conducen a pensar que el AgO tendría un papel en la regulación de la secreción de IL-8 y no necesariamente dependiente de TLR4.

### Ensayo de Multiplex Luminex® para IL-8



### Ensayo de Multiplex Luminex® para IL-1β



**Figura 6.** La infección por 24 horas con cepas de *P. gingivalis* que poseen AgO disminuye los niveles de citoquinas pro-inflamatorias liberadas por las células OKF6/TERT2, de manera independiente de TLR4. Se muestra las veces de cambio de IL-8 e IL-1β. Se asignó arbitrariamente el valor 1,0 para el control correspondiente a células sin infectar y sin anti-TLR4. \*\* indica diferencias significativas considerando un valor de  $p < 0,01$  con respecto a cada control respectivo; # indica diferencias significativas considerando un valor de  $p < 0,05$  con respecto a la cepa silvestre W50 y a la cepa complementada respectiva. Este ensayo fue realizado en duplicado, con  $n=3$ . Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de doble vía y posteriormente test Bonferroni.

### **5.3 El antígeno O de *Porphyromonas gingivalis* favorece un fenotipo migratorio en las células OKF6/TERT2 que se potencia por el bloqueo de TLR4**

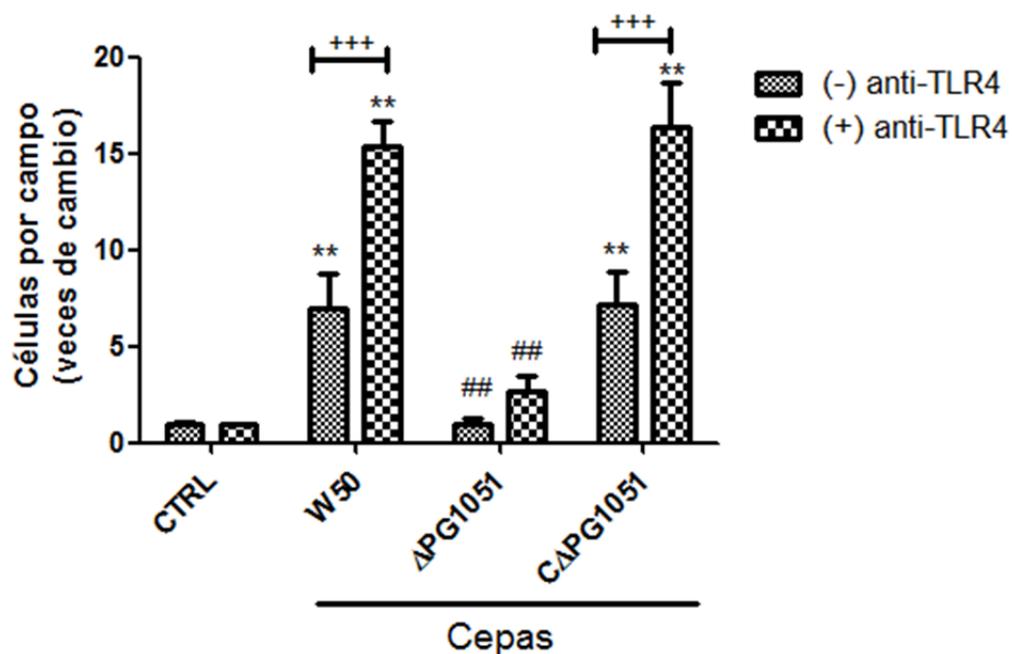
Una de las características clínicas más importantes en los casos de periodontitis severas es la pérdida de piezas dentales producto de la resorción del hueso periodontal y de la disminución de la masa gingival (encías). Este último efecto es debido a la acción de metaloproteinasas que degradan la matriz y a la migración apical de las células, debido a la acumulación de microorganismos entre la línea de la encía y el diente, que se traduce como pérdida de inserción de este último (49). Hasta ahora, no se han publicado trabajos que propongan que algún factor de virulencia específico de *P. gingivalis* esté involucrado en el cambio a un fenotipo más migratorio de estas células a causa de la enfermedad. Dados los antecedentes de Díaz y cols 2015 (46), en el que aislados provenientes de individuos sanos carecían del dominio estructural del AgO, a diferencia de los aislados de pacientes con periodontitis, es que quisimos evaluar la participación del AgO de *P. gingivalis* en el proceso de migración celular y de qué manera TLR4 podría estar regulándolo.

Para ello, TLR4 fue bloqueado usando 0,25 µg/mL de PE/Cy7 anti-mouse TLR4 (CD284/MD2 complex), el cual se agregó 1 hora antes, durante y por el tiempo post-infección al medio de las células OKF6/TER2, como se realizó en el

ensayo de medición de citoquinas. Luego de la infección las células se dejaron migrar durante 2 horas y finalmente fueron contadas.

Los resultados muestran que hubo un aumento significativo de aproximadamente 5 veces de las células que fueron capaces de migrar luego de ser infectadas solamente con la cepa silvestre W50 y la cepa complementada, con respecto al control sin infectar **(Figura 7)**. Interesantemente, este cambio incrementó más cuando TLR4 fue bloqueado. Sin embargo, esto se observó sólo en estas dos condiciones, puesto que con la mutante  $\Delta PG1051$ , el bloqueo del receptor no afectó la migración. Por otro lado, si se compara esta última con la cepa silvestre W50 o la cepa complementada se ve que también existe una diferencia significativa, ya que la cepa mutante se comporta de manera similar al control. Por lo tanto, esto sugiere que el AgO de *P. gingivalis* contribuye a regular el proceso migratorio de las células epiteliales un cuadro de periodontitis, promoviendo pérdida de inserción dental.

## Migración de células OKF6/TERT2



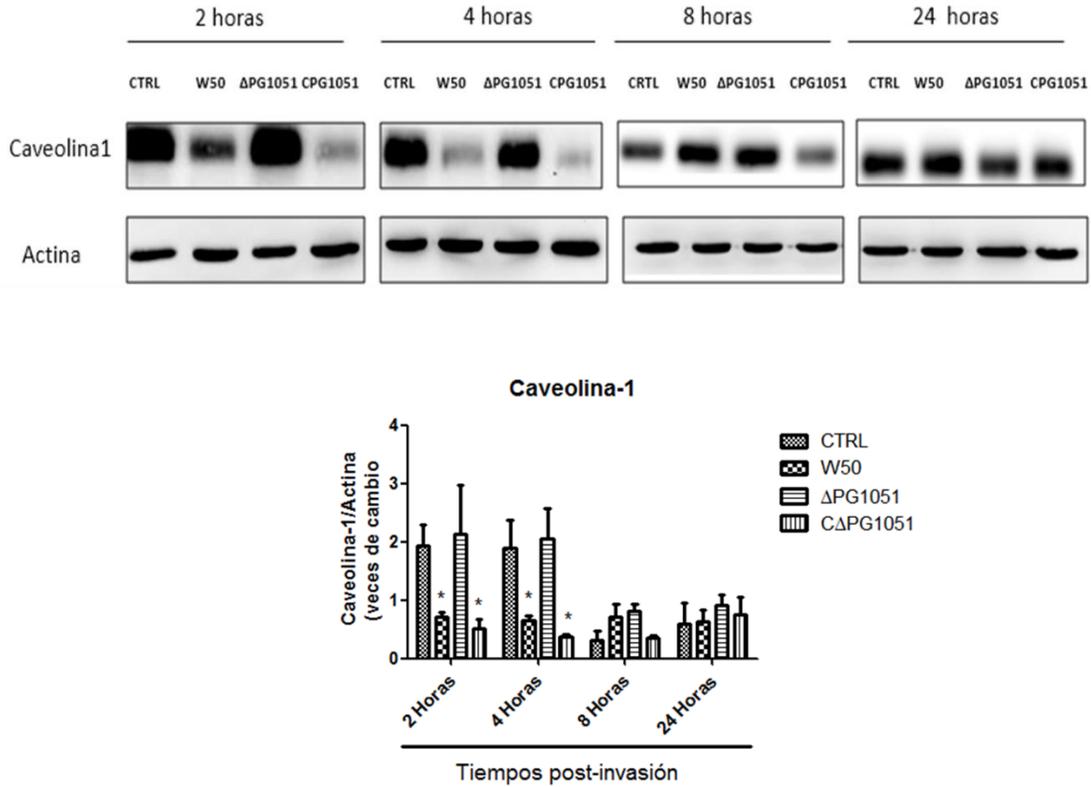
**Figura 7.** La infección por 2 horas con las cepas de *P. gingivalis* que poseen AgO aumenta la migración de células OKF6/TERT2. Las células OKF6/TERT2 fueron infectadas con las 3 cepas de *P. gingivalis* durante 2 horas y se dejaron migrar por otras 2 horas más. Luego, se contaron las células que lograron transmigrar en 7 campos diferentes y el promedio fue graficado. Se observan los resultados de la infección sin bloquear TLR4 y bloqueando TLR4. \*\* indica diferencias significativas considerando un valor de  $p < 0,01$  con respecto a cada control respectivo; ## indica diferencias significativas considerando un valor de  $p < 0,01$  con respecto a la cepa silvestre W50 y a la cepa complementada respectiva y +++ indica diferencias significativas considerando un valor de  $p < 0,001$  con respecto a la infección bloqueando TLR4. Este ensayo fue realizado con  $n=3$ . Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de doble vía y posteriormente test Bonferroni.

Una proteína estudiada ampliamente en nuestro laboratorio y que ha sido relacionada con la migración celular en un contexto pro-inflamatorio y de cáncer es Caveolina-1 (CAV1) (61). CAV1 es una proteína de 21-24 kDa involucrada en la formación de caveolas, tráfico celular, homeostasis del colesterol y transducción de señales (62). No existen antecedentes que involucren a CAV1 con la progresión de la enfermedad periodontal, pero hay estudios que la relacionan con el proceso de internalización de la bacteria por medio de caveolas (63). Se ha visto, por ejemplo, que un knockdown de CAV1 en células orales epiteliales humanas disminuye los niveles de invasión de *P. gingivalis* (64). Si bien, no hay un nexo directo entre CAV1 y la migración en periodontitis, se sabe que CAV1 interactúa con integrina  $1\beta$ , la cual está relacionada con el proceso migratorio (65) y cuyos niveles en células epiteliales gingivales humanas aumentan luego de la exposición a IL-8 (citoquina relacionada ampliamente con el desarrollo de la enfermedad periodontal). Estos antecedentes llevan a preguntar si los cambios que observamos en el fenotipo migratorio podrían estar relacionados con cambios en la expresión de CAV1. Para determinar si los niveles de CAV1 cambiaban producto de la exposición a la bacteria, células OKF6/TERT2 fueron infectadas con las 3 diferentes cepas de *P. gingivalis*, con 2, 4, 8 y 24 horas post-infección. Luego se obtuvieron los extractos proteicos de cada condición y se separaron las proteínas mediante Western blot.

Los resultados (**Figura 8**) muestran que a tiempos tempranos (2 y 4 horas) la infección con la cepa silvestre W50 y la cepa complementada

disminuyeron significativamente los niveles de CAV1 con respecto al control de 2 y 4 horas, respectivamente. A esa misma temporalidad, la infección con la cepa mutante  $\Delta PG1051$  no cambió los niveles de la proteína, los que permanecieron similares al control. Por otra parte, a tiempos tardíos de infección (8 y 24 horas) la infección con cualquiera de las 3 cepas no afectó los niveles de CAV1. Además se ve una disminución de CAV1 en los controles de estos tiempos. Este cambio sugiere que CAV1 podría estar relacionada a los cambios observados en la migración celular a las 2 horas de infección, pero de manera contraria a lo descrito en la literatura.

### Niveles de Caveolina-1 a distintos tiempos de infección con *P. gingivalis*



**Figura 8.** La infección de las células OKF6/TERT2 con las cepas de *P. gingivalis* que poseen AgO disminuyen los niveles proteicos de Caveolina-1 a las 2 y 4 horas. Las células OKF6/TERT2 fueron infectadas con las 3 cepas de *P. gingivalis* durante cuatro tiempos diferentes y luego se obtuvieron los extractos proteicos de cada condición. La concentración de proteínas fue determinada y se cargaron 50 ug de cada muestra por carril. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles al 12% y se analizaron mediante Western blot con anticuerpos contra Caveolina-1 y Actina (control de carga). El gráfico muestra el promedio de 3 experimentos independientes de la relación Caveolina-1/Actina. \* indica diferencias significativas considerando un valor de  $p < 0,05$  con respecto a cada control respectivo. Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de doble vía y posteriormente test Bonferroni.

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo general de esta memoria fue determinar si el AgO de *P. gingivalis* estaba involucrado en la activación de TLR4 y el cambio en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Además, se estudió si estaba relacionado con un aumento del fenotipo migratorio de células epiteliales orales.

### 6.1 La presencia o ausencia del AgO de *P. gingivalis* no contribuye a aumentar los niveles de TLR4 en la superficie celular.

El sistema inmune innato es el responsable de generar la primera respuesta inflamatoria que recluta y activa al sistema inmune adaptivo. Los TLRs poseen un rol muy importante en el reconocimiento de PAMPs y en la activación de las vías de señalización que promueven inflamación, fagocitosis y muerte celular; todo esto con el fin de eliminar la amenaza que se presenta (66). TLR4 reconoce al LPS bacteriano y aumenta la secreción de mediadores pro-inflamatorios a través de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (67). Esta respuesta se potencia gracias al efecto de retroalimentación positiva que algunas citoquinas como TNF- $\alpha$  tienen sobre el promotor de TLR4 (68), promoviendo su aumento en la superficie celular con el fin de aumentar los sitios de reconocimiento del LPS. Nuestro trabajo mostró que después de infectar por 24 horas con *P. gingivalis* no hubo un aumento significativo de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2, independiente de la presencia o ausencia de AgO en las cepas con que se infectó. Lo mismo

sucedió con TLR2. Aunque estos hallazgos no son lo que se esperaba, podrían explicarse como consecuencia de los mecanismos que activa la bacteria para escapar del sistema inmune, por ejemplo, de su capacidad para permanecer oculta dentro de los fagosomas tardíos, alterando el proceso de autofagia en su propio beneficio (29). Por otra parte, el trabajo de Soto y cols 2015 (46), mostró que al infectar GECs por 24 horas, usando las cepas que poseían AgO, aumentaban los niveles de ARNm de TLR4. Considerando este antecedente, podríamos sugerir que la bacteria participaría en la transcripción de TLR4 pero no en el aumento de la proteína en la superficie.

La infección con *P. gingivalis* no sólo ha sido estudiada en el contexto del LPS. Dentro de sus factores de virulencia existen unas proteasas conocidas como gingipainas cuya función es degradar proteínas y proveer de nutrientes a la bacteria (33). La presencia de ellas también podría explicar el efecto que vimos sobre los niveles de TLR4. Se sabe que las gingipainas son capaces de degradar a CD14 de los monocitos (69). CD14 es una glicoproteína que se encuentra en forma soluble o anclada a la membrana de la superficie de los monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células endoteliales y cuya principal función es transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD2) (70). Otros estudios también muestran que CD14 está presente en fibroblastos gingivales humanos (71). Por lo tanto, podría ser que nuestros resultados no arrojaron un aumento significativo de TLR4 en la superficie de las células OKF6/TERT2 porque estas proteasas intervinieron en

el óptimo reconocimiento del LPS de *P. gingivalis*. De ser así, esto también podría afectar la secreción de mediadores inflamatorios.

La manera de corroborar esta hipótesis sería utilizar un inhibidor de gingipainas (disponible comercialmente) y volver a medir los niveles de TLR4 en la superficie de GECs. Además, sería conveniente evaluar cambios en los niveles de TLR4 en el tiempo, agregando un tiempo más tardío, por ejemplo 48 horas, lo que permitirá esclarecer si la expresión de la proteína en la superficie necesita un mayor tiempo de infección.

## **6.2 La presencia del AgO de *P. gingivalis* disminuye los niveles de IL-8, de manera independiente de TLR4.**

La inflamación es un proceso clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Si bien, la presencia de patógenos periodontales como *P. gingivalis* contribuyen al establecimiento y progresión de la enfermedad, esta última también dependerá de la respuesta del hospedero. Si se gatilla un proceso inflamatorio que no es tratado puede propagarse al tejido conectivo adyacente y eventualmente producir la degradación de él y del hueso alveolar, terminando en la pérdida del diente (1). Algunas citoquinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se han encontrado aumentadas en líquido crevicular y en el saco periodontal (9). El aumento de ellas es necesario para producir el reclutamiento de células del sistema inmune, como neutrófilos, al sitio de infección (72) y, también contribuyen a la inducción de moléculas de adhesión y

otros mediadores que facilitan y amplifican la respuesta inflamatoria y la estimulación de metaloproteinasas de matriz (73). Esto lleva a preguntar de qué manera el AgO de *P. gingivalis* afectaba la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias y cómo esto podría estar relacionado con presencia de signos clínicos en los pacientes con periodontitis versus los individuos sanos. Nuestros resultados mostraron que los niveles de IL-8 secretados disminuyeron significativamente cuando se infectó con las cepas que poseían un AgO completo (silvestre y complementada). En el caso de IL-1 $\beta$ , los cambios no fueron significativos y en lo que respecta a TNF- $\alpha$ , su nivel estuvo por debajo del límite de detección. De acuerdo con esto se podría especular que el AgO de *P. gingivalis* participaría en la regulación de la secreción de IL-8. Estos hallazgos son sumamente interesantes, considerando que la mayoría de los estudios en donde se analizan los niveles de interleuquinas pro-inflamatorias en el contexto de periodontitis describen un aumento tanto de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (9, 33). Por otro lado, un estudio realizado por Zhang y cols. 1999 (74), demostró que IL-8 podía ser degradada por las proteasas de *P. gingivalis*, al igual como ocurre con la proteína CD14. Al parecer las gingipainas tienen un alto impacto en la modulación del proceso inflamatorio, ya que su sustrato no solamente es IL-8, sino que varias citoquinas pro-inflamatorias como: IL-1 $\beta$  (75), TNF- $\alpha$  (76), entre otras y otros componentes del sistema inmune como proteínas del complemento. Con ello, impiden un óptimo reclutamiento de los neutrófilos, logrando de esta manera, producir una desregulación de la

respuesta inmune. Ahora bien, ¿por qué no son todas las citoquinas afectadas de la misma manera? Dentro del pull de gingipainas de *P. gingivalis*, se sabe que la actividad proteasa se debe a dos cisteína-proteasas (77). Ambas han sido caracterizadas y se conocen como arginina-gingipaina (Rgp) (78) y lisina-gingipaina (Kgp) (79). Estas poseen sitios de corte específicos, por lo tanto, las interleuquinas, al no tener las mismas secuencias aminoacídicas podrán presentar más o menos sitios de corte para las proteasas, haciéndolas diferencialmente susceptibles a ellas. Otro punto importante es la disponibilidad de las citoquinas pro-inflamatorias en el momento en que son cuantificadas, pues los tiempos de vida media de cada una son diferentes, y la rapidez con que se secreten dependerá de la función que cumplan.

Para poder analizar de mejor manera cómo el AgO de *P. gingivalis* afecta la secreción de citoquinas pro-inflamatorias sería más conveniente realizar una medición a distintos tiempos de infección y utilizando un inhibidor de proteasas.

Es importante resaltar que una limitante de nuestro modelo de estudio es que se reduce sólo a un tipo de bacteria y a un tipo de célula eucarionte, considerando que la periodontitis es una enfermedad que involucra la participación de una comunidad microbiana y varios tipos de células hospederas (epiteliales, inmunes, etc).

Una de las consecuencias de la activación de TLR4 es la translocación al núcleo del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, donde se une a la región

promotora de los genes de respuesta inflamatoria (80). Es por esto por lo que se evaluó la participación de TLR4 en la secreción de mediadores inflamatorios. Nuestros experimentos mostraron que cuando el receptor era bloqueado usando un anticuerpo, no hubo cambios significativos en los niveles de IL-8 o IL-1 $\beta$ , sugiriendo que TLR4 no estaría interviniendo en los cambios observados en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, debemos considerar que no se realizaron estudios para confirmar el anticuerpo bloqueara efectivamente al receptor. Además, el anticuerpo usado para ello no presentaba la especificidad necesaria para asegurar el bloqueo óptimo de TLR4. En este punto, como proyección de este trabajo se sugiere utilizar un anticuerpo diseñado especialmente para el bloqueo de TLR4 o silenciar la expresión del receptor mediante un shRNA, y comprobar mediante Western Blot que las proteínas que están río abajo no se están activando. Estos experimentos se encuentran actualmente en curso.

### **6.3 La presencia del AgO de *P. gingivalis* contribuye a aumentar la migración de las células OKF6/TERT2.**

La migración de células epiteliales juega un rol importante en muchos procesos fisiológicos como la morfogénesis y curación de heridas. Además, la migración celular es una parte esencial de varios procesos patogénicos, incluidos enfermedades inflamatorias crónicas e invasión tumoral (51). En el caso de la periodontitis, la inflamación constante da lugar a la producción de

ciertas citoquinas como RANK-L, que junto con TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  contribuyen a la activación de osteoclastos (51), lo que da lugar a la pérdida ósea. Al quedar sin soporte periodontal, las células epiteliales migran de forma patológica en sentido apical, presentándose clínicamente como el saco periodontal (51). Este cambio es visible en las personas que padecen periodontitis, pero no lo es en aquellos pacientes clínicamente sanos, a pesar de que estos últimos poseen una biopelícula subgingival no patogénica. Considerando lo anterior se desarrolló un ensayo que nos permitiera evaluar si el AgO de *P. gingivalis* contribuía a alterar el fenotipo migratorio de GECs. Nuestros resultados muestran que cuando el AgO está presente, las células exhiben un aumento importante de la migración celular. Este hallazgo es sumamente importante en el estudio de la enfermedad periodontal, ya que a la fecha no se había relacionado directamente a algún factor de virulencia específico con este fenotipo.

Existen varios estudios que relacionan a TLR4 con migración celular, por ejemplo, se ha visto que cuando células metastásicas de cáncer de mama son estimuladas con LPS aumentan significativamente su migración (81). Además, en un trabajo realizado en el contexto de isquemia cerebral se logró establecer la participación de TLR4 en la modulación de la migración celular de neuroblastos de ratones (82). Estos antecedentes llevaron a investigar si TLR4 estaría involucrado en el aumento del fenotipo migratorio de GECs. Lo que pudimos observar es que cuando TLR4 era bloqueado usando un anticuerpo, la

migración aumentó en los casos en que se infectó con cepas que poseen AgO. Este aumento fue casi 3 veces mayor que el observado cuando TLR4 no estaba bloqueado. Si bien este hallazgo tiene limitaciones dado que no se comprobó que el receptor disminuyera su funcionalidad, sugiere que TLR4 estaría contribuyendo al aumento en el fenotipo migratorio. Una de las hipótesis que surge de esto es que la bacteria sería capaz de promover migración celular a través de vías de señalización que no están necesariamente relacionadas con TLR4.

Para encontrar un posible mecanismo que explique el aumento observado en la migración de GECs analizamos los niveles de CAV1 en el tiempo, debido a que esta proteína está relacionada con el proceso migratorio y ha sido muy poco estudiada en el contexto de enfermedad periodontal. Nuestros resultados muestran que la infección con cepas que poseen AgO disminuye significativamente los niveles de CAV1, a tiempos tempranos (2 y 4 horas de infección), mientras que a tiempos tardíos (8 y 24 horas de infección) los niveles de CAV1 parecen recuperarse. Esto es contrario a lo descrito en la literatura (83), donde se observa que a mayores niveles de la proteína aumenta la migración. No obstante, es recomendable medir los niveles de CAV1 fosforilada, los cuales darán cuenta de la activación de la proteína.

En resumen, este trabajo demostró que el AgO de *P. gingivalis* es necesario para favorecer el progreso de la enfermedad periodontal,

promoviendo la migración de las células epiteliales orales. Si bien no se logró establecer una participación clara de TLR4 y del aumento de citoquinas pro-inflamatorias, actualmente se están realizando nuevos experimentos que complementan los resultados de esta tesis y que contribuirán a entender de mejor manera la participación del LPS de *P. gingivalis* en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Por lo tanto, la nueva hipótesis que se podría reformular a partir de estos hallazgos sería: El antígeno O de *Porphyromonas gingivalis* disminuye los niveles de Interleuquina-8 de manera independiente de TLR4 y contribuye a aumentar el fenotipo migratorio en queratinocitos orales humanos (OKF6/TERT2).

## 7. CONCLUSIONES

- El AgO del LPS de *P. gingivalis* no contribuye a modificar los niveles de TLR4 en la superficie de GECs.
- El AgO de *P. gingivalis* disminuye los niveles de IL-8 secretados por GECs.
- El AgO de *P. gingivalis* favorece un fenotipo migratorio en GECs.

## 8. REFERENCIAS

1. Eke P.I. y *co/s*. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. Journal of Dental Research 91(10):914-920, 2012.
2. Gamonal J. y *co/s*. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean national dental examination survey. Journal of Periodontology. 81(10): 1403-1410, 2010.
3. Van Dyke, T. E. y Sheilesh, D. Risk factors for periodontitis. Journal of the International Academy of Periodontology. 7, 3–7, 2005.
4. Rioboo Crespo M y Bascones A. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal: factores genéticos. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral.17, 2: 69-77, 2005.
5. Graves, D. T. y *co/s*. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology. 35, 89–105, 2008.
6. Hajishengallis, G. y Lamont, R. J. 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, 2012.
7. Tonetti M.S., Imboden M.A. y Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. Journal of Periodontology. 69: 1139–1147, 1998.
8. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology. 15(1): 30–44, 2015.

9. Champagne C. M. E. y cols. Potential of gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal disease. Periodontology 2000. 31:167-180, 2003.
10. Mantovani A. y cols. Cancer-related inflammation. Nature. 454:436-444, 2008.
11. Southerland J.H. y cols. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. Periodontology 2000. 40:130–143, 2006.
12. Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. Annals of Periodontology. 6:197–208, 2001.
13. Nakib S. y cols. Periodontal disease and risk of psoriasis among nurses in the United States. Acta Odontologica Scandinavica. 71:1423-1429, 2013.
14. Rosenquist K. y cols. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case–control study in southern Sweden. Acta Oto-Laryngologica 125:1327–1336, 2006.
15. Abnet C.C. y cols. Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. Cancer Causes Control. 12:847–854, 2001.
16. Fitzpatrick S.G. y Katz J. The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. American Journal of Dentistry. 38:83-95, 2010.

17. Stolzenberg-Solomon R.Z. y cols. Tooth loss, pancreatic cancer, and *Helicobacter pylori*. The American Journal of Clinical Nutrition. 78:176–181, 2003.
18. Abusleme L. y cols. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME Journal. 7: 1016-1025, 2013.
19. C. Bodet, F. Chandad, y D. Grenier, Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. Pathologie Biologie, 55, 154–162, 2007.
20. Hajishengallis y cols. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through commensal microbiota and complement. Cell Host Microbe. 10: 497, 2011.
21. Gajardo M. y cols. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. Journal of Periodontology. 76: 289-294, 2005.
22. Shah H. N. y Collins M. D. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. International Journal of Systematic Bacteriology. 38, 128–131, 1998.
23. Noiri Y. y cols. An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus*

- in human periodontal pockets. Journal of Periodontal Research. 32:598-607, 1997.
24. Belton C.M, y cols. Fluorescence image analysis of the association between *Porphyromonas gingivalis* and gingival epithelial cells. Cell Microbiology. 1:215-223, 1999.
  25. Lamont R.J. y cols. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infection and Immunity. 63:3878-3885, 1995.
  26. Rudney J.D., Chen R. y Sedgewick G.J. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. Infection and Immunity. 69:2700-2707, 2001.
  27. Deshpande R.G., Khan M.B. y Genco C.A. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity. 66:5337-5343, 1998.
  28. Amornchat C. y cols. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into human gingival fibroblasts in vitro. Journal of International Academy of Periodontology. 5:98-105, 2003.
  29. Kozarov E. Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis. Future Cardiology. 8: 123–38, 2012.
  30. Maiuri M. C y cols. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Molecular Cell Biology. 8: 741-752, 2007.

31. Olsen I. y Progulske-Fox A. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. Journal of Oral Microbiology. 7: 28788, 2015.
32. Yamatake K. y cols. Role for gingipains in *Porphyromonas gingivalis* traffic to phagolysosomes and survival in human aortic endothelial cells. Infection and Immunity. 75: 2090–2100, 2007.
33. Adrians E., Grenier D. y Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. Journal of Dental Research. 85(5): 392-403, 2006.
34. Mysak J. y cols. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. Journal of Immunology Research. 2014.
35. Raetz CR y Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry. 71:635-700, 2002.
36. Herath T. D. K. y cols. Tetra- and Penta-acylated Lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF-κB signal transduction cascade and Immuno-inflammatory response in human gingival fibroblast. Plos ONE. 8(3), 2013.
37. Branderburr K. y Seydel U. Conformation and supramolecular structure of lipid A. Advances in Experimental Medicine and Biology. 667: 25-38, 2010.
38. Dixon D.R., y Darveau R. P. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. Journal of Dental Research. 84, 584-595, 2005.

39. Monaster N. y cols. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Infection and immunity. 74(8): 4474–4485, 2006.
40. InvivoGen. Toll-Like Receptor – TLRs. [en línea] <  
<http://www.invivogen.com/tlr?gclid=Cj0KEQjwINy8BRC676W0JezxbwBEiQA4Ydg0fF6e1Lc1yDqJiiXPYFehj7Utig1Pm2SNnwAOVBXtfMaAt-38P8HAQ>>  
[consulta: 27 de diciembre de 2017]
41. Song B. y cols. The role of Toll-like receptor in periodontitis. Oral Diseases. 23, 168-180, 2017.
42. Kawai T. y Akira S. TLR signaling. Cell Death & Differentiation – Nature. 13:816-825, 2006.
43. Kirikae, T. y cols. Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of *Salmonella* LPS. Infection and Immunity. 67, 1736–1742, 1999.
44. Hirschfeld, M. y cols. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. The Journal of Immunology. 1950 165, 618–622, 2000.
45. Díaz L y cols. Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. Anaerobe. 33:25-32, 2015.

46. Soto C. y cols. The *Porphyromonas gingivalis* O antigen is required for inhibition of apoptosis in gingival epithelial cells following bacterial infection. Journal of Periodontal Research. 51(4): 518-28, 2015.
47. Dickson M.A. y cols., Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. Molecular and Cellular Biology 20. 1436-1447, 2000.
48. Bosshardt D.D. y Lang N.P. The junctional epithelium: from health to disease. Journal of Dental Research. 84:9–20, 2005.
49. Botero J. E. Immune response in the periodontium: from health to disease and therapeutic implications. Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquía. 21 (1): 122-128, 2009.
50. Jiang D. y cols. Positive feedback regulation of proliferation in vascular smooth muscle cells stimulated by lipopolysaccharide is mediated through the TLR4/Rac-1/Akt pathway. PLOS One. 9(3): e92398, 2014.
51. Katso R. y cols. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 17:615–675, 2001.
52. Díaz J. y cols. A novel caveolin-1/p85 $\alpha$ /Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion. Communicative & Integrative Biology. 7(5), 2014.

53. Shi H. *y cols.* Basic fibroblast growth factor promotes melanocyte migration via activating PI3K/Akt-Rac1-FAK-JNK and ERK signaling pathways. IUBMB Life. 68(9):735-47, 2016.
54. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. Journal of Periodontology. 66:852–859, 1995.
55. Gillitzer R. *y* Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. Journal of Leukocyte Biology. 69:513–521, 2001.
56. Zhang W. *y cols.* Interaction with neutrophils promotes gastric cancer cell migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. Oncology Reports. 38(5):2959-2966, 2017.
57. Paramonov N.A. *y cols.* 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, 2009.
58. Park B.S. *y cols.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. Nature. 458:1191–1195, 2009.
59. Teles R. *y cols.* Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. Journal of Periodontology. 81: 89–98, 2010.

60. Labclinics. ¿Qué es un Luminex Multiplex y por qué se utiliza cada vez más?  
[en línea] < <http://www.labclinics.com/luminex-multiplex-usos-tecnologia/>>  
[consulta: 14 de enero de 2018]
61. Díaz J. y cols. Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. Journal of Cell Science. 127(11): 2401–2406. 2014.
62. Quest A. F. y cols. The caveolin-1 connection to cell death and survival. Current Molecular Medicine. 13, 266–281. 2013.
63. Tamai R., Asai Y. y Ogawa T. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity. 73(10):6290-8. 2005.
64. Boisvert H. y Duncan M. Clathrin-dependent entry of a gingipain adhesin peptide and *Porphyromonas gingivalis* into host cells. Cellular Microbiology. 10(12): 2538-2552. 2008.
65. Horiguchi K. y cols. Caveolin 3-mediated integrin  $\beta$ 1 signaling is required for the proliferation of folliculostellate cells in rat anterior pituitary gland under the influence of extracellular matrix. Journal of Endocrinology. 210(1):29-36. 2011.
66. Achek A., Yesudhas, D. y Choi, S. Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. Archives of Pharmacal Research. 39, 1032–1049. 2016.

67. Chow J. C. y cols. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. The Journal of Biological Chemistry. 274, 10689–10692. 1999.
68. PÉREZ Nuñez, Ramón Daniel. Regulación de la expresión del Receptor Tipo Toll 4 (TLR4) por el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  y Glucocorticoides. Memoria para optar al título de Bioquímico. Santiago, Chile. 2008.
69. Sugawara S. y cols. Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. Journal of Immunology. 165: 411–418, 2000.
70. Heumann D. y cols. The pathogenic role of LBP in gram-negative sepsis and septic shock. Progress in Clinical and Biological Research. 397:379-86, 1998.
71. Sugawara S. R. y cols. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and agonist of lipopolysaccharide activation of human gingival fibroblast and monocytes in a CD14-dependent manner. Infection and Immunity. 67:1623, 1999.
72. Bender, J. S., Thang, H., and Glogauer, M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. Journal of Periodontal Research. 41, 214–220, 2006.
73. Graves D.T. y Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. Journal of Periodontology. 74(3):391-401, 2003.

74. Zhang J. y cols. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. Microbial Pathogenesis. 26(5):275-280, 1999.
75. Fletcher J. y cols. Cytokine degradation by biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. Current Microbiology. 36: 216-219, 1998.
76. Calkins C. C. y cols. Inactivation of tumor necrosis factor by proteinases (gingipains) from periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications for immune evasion. The Journal of Biological Chemistry. 273: 6611-6614, 1998.
77. Potempa J. y cols. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. Infection and Immunity. 63:1167, 1995.
78. Cutler C. W. y cols. Pathogenic strategies of oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. Trends in Microbiology. 3:45. 1995.
79. Pike R. W y cols. Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*: isolation, characterization, and evidence for the evidence of complexes with hemagglutinins. The Journal of Biological Chemistry. 269:406. 1994.
80. López-Bojorquez L N. La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. Revista de investigación clínica. 56(1):83-92, 2004.

81. Li J. y cols. TLR4 promotes breast cancer metastasis via Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin pathway upon LPS stimulation. The Anatomical Record. 300(7):1219-1229. 2017.
82. Moraga A. Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. The FASEB Journal. 28(11):4710-8, 2014.
83. Quest A.F., Leyton L. y Parraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. Biochemistry and Cell Biology. 2004; 82:129-144. 2004.