

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***CO-CULTIVO DE POPHYROMONAS GINGIVALIS Y HELICOBACTER
PYLORI AUMENTA LA VIRULENCIA DE P. GINGIVALIS Y LA
MIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES GINGIVALES INFECTADAS***

**Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al grado
académico de Doctor en Bioquímica, por:**

CRISTOPHER ENRIQUE SOTO LÓPEZ

**Directores de tesis: Dr. Andrew Frederick Geoffery Quest
Minikus**

Dra. Denisse Margarita Bravo Rodríguez

Santiago-CHILE

Mayo 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

CRISTOPHER ENRIQUE SOTO LÓPEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público rendido el día 16 de mayo del 2022

Director de Tesis:

Dr. Andrew Quest Minikus

Directora de Tesis:

Dra. Denisse Bravo Rodríguez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Margarita Vega

Dr. Carlos Santiviago

Dr. Francisco Aguayo

Dr. Guillermo Diaz

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología Oral, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, y en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Fue financiado por los proyectos Fondo de Investigación Avanzada en Áreas Prioritarias (FONDAP) 15130011, Fondo de investigación en Ciencia y Tecnología (FONDECYT) 1170925, 1210644 and 1200877 y Fondo para la Investigación en Odontología (FIOUCh) 17/020. Los estudios de Postgrado del autor fueron financiados por CONICYT/ANID: CONICYT-PCHA/DoctoradoNacional/2016-21160942.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años de doctorado han ocurrido una infinidad de eventos que ha traído personas a mi vida, y a otras las ha llevado por otros caminos. Sea donde sea que estén, les agradezco infinitamente haber sido parte de este periodo de mi vida. No importa lo pequeño o grande, cada uno fue parte de esta experiencia.

A **CONICYT/ANID** por otorgarme la beca de doctorado nacional, sin ella nuevamente mis estudios hubiesen sido imposibles.

A mis directores de tesis, **Denisse y Andrew**, por la infinita paciencia que han tenido en un candidato a doctor totalmente fuera de lo común. Muchas gracias por su apoyo, la confianza entregada y la comprensión que tuvieron en el accidentado camino a obtener este grado.

A cada persona que estuvo durante estos años en el laboratorio de Microbiología Oral. A **Daniela, Darna, Vicky, Carla, Luciano, Marcela, Lucas, Martin, Nia, Jessica y Héctor**. Compartir laboratorio con ustedes hizo cada uno de esos días un respiro del caos en mi vida. Gracias por el apoyo, las sonrisas y risas, la preocupación y el infinito amor que me dieron cuando más lo necesite. También a cada persona que me apoyo en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares en el camino de la biología molecular, especialmente agradecimientos a **Alejandra, Alejandro, Antonio, Pedro y Lore**, que cada vez que llegue con una pregunta o un millón de dudas, me ayudaron sin dudarlo. Sea donde sea que me lleve el camino después de esto, les deseo mucho éxito en todo. A los profesores también, a **Anilei, Nico y Lore** por toda la ayuda que me ofrecieron para avanzar con el grado.

A **Valentina**, porque la última vez que le agradecí escribí: “gracias por ser una gran amiga a pesar de las circunstancias”, y aun así luego de años sigues acá. Muchísimas gracias por ser una excelente amiga y sin duda, me maravilla ver lo lejos que has llegado en tu vida. Agradecer también a **Fernanda**, a.k.a Frenshi, que a pesar de la distancia, siempre tuviste buenos deseos y ánimos en un camino que a pesar de ser distinto en muchos sentidos, lo vivimos desde el mismo caos.

A **Diego**. Si bien el destino nos quiso en caminos distintos, toda la primera parte de esta tesis recayó en tus hombros. Te agradezco infinitamente que cada vez que el pánico crecía en mí, aparecías sin preguntas a mi lado dispuesto a solo callar y a mantenerme en paz de la forma que fuese necesaria. Gracias por dar luz en los momentos donde nada parecía tener una respuesta y por, a pesar la distancia y el miedo que existía en ambos frente a los nuevos caminos que tomamos, siempre hacerme un tiempo a tu lado.

A los niños de Rol / Lol-Valo / Discord: A **Carlos, Carrasco, Edu, Franco, Johe, Lucas T, Lucas V, Seba, Vicho y Yoggi**. Por tener siempre buenas palabras cada vez que me conectaba y les hablaba de mis experimentos fallidos o cualquier problema relacionado con esta tesis. Es probable que no lo sepan (o al menos hasta cuando lean esto), pero que nuestros caminos se encontraran en mundos lejanos como Caldria, Epherion, Komuria, Runaterra o Vaetera, ha sido un respiro en tiempos donde solo sentía un espiral

de temores y errores. Conocerlos no solo en reinos lejanos, sino también en persona, ha significado una sonrisa que no esperaba encontrar cada vez que mi micrófono se apagaba o tomaba el tren de vuelta a Santiago. No importa cuanto más dure esto, cuantas veces más pueda curarlos con mi siguiente clérigo o cuantas partidas más con Lux/Sage tengan que soportar por mí, agradeceré por siempre que el destino los haya puesto en esta etapa de mi vida.

A mi familia cercana: A **Ana, Roberto y Jurian**. No es necesario agradecerles porque cada día que despierto cerca de ustedes notaran lo importante que fueron para mí. Su eterna confianza en este eterno estudiante es el mejor regalo que podría pedir en las personas con las cuales comparto sangre. Agradezco también a toda mi familia, a **Erick, Nicole, Jonathan, Anahis, Lorena, Ketty, Camila, Rosi, Rosa y Andrés**, sus palabras y buenos ánimos siempre fueron un agrado de escuchar. Agradecimientos especiales a usted **Tía Ceci**, porque mientras escribo esto, sé que donde sea que este, me sonrío feliz de haber llegado al final de este camino, donde cada vez que la veía, a pesar de los meses de intervalos y el gran cansancio, siempre tuvo un buen abrazo y la forma perfecta de hacerme sentir que aun pertenecía en el mundo. Espero le deje el recado a mi **Abuela**.

Finalmente, a ti, **Kael**. Tu más que nadie sabes que este logro es también tuyo. En las oscuridades más profundas del camino, fuiste tu quien me recordó el amor que tengo por la ciencia y por cada cosita que hago, fuiste tú quien reinstauró en mi la confianza para seguir caminando por algo que parecía imposible en esos momentos. Por cada abrazo que me diste mientras la ansiedad era invencible, por cada sonrisa que me compartiste para demostrarme que nada es imposible, por cada mano que me diste para ponerme nuevamente en el camino, es que estoy nuevamente en deuda contigo. Es imposible demostrarte con estas palabras mi eterno agradecimiento, pero que aún estes conmigo para celebrar este fin de etapa, es el mejor regalo que podría obtener. Juntos somos invencibles. Te amo, de aquí y hasta siempre,

**A todos,
Muchísimas gracias.**

Los resultados y conocimientos generados de la presente tesis dieron origen total o parcial a las siguientes presentaciones a congresos y publicaciones.

- **Presentaciones a congresos nacionales:**

Rojas-Celis, Victoria; Martínez, Samuel; García-Sesnich, Jocelyn; Venegas, Darna; **Soto, Christopher**; Bravo, Denisse; Quest, Andrew. *Porphyromonas gingivalis* AgO - mediated activation of TLR4 increases proinflammatory cytokine and migration levels of OKF6/TERT2 cells. XXXIX Congreso Chileno de Microbiología. 14-17 de noviembre 2017, La Serena, Chile.

Soto, Christopher; Olivera, Marcela; Rojas, Victoria, Venegas, Darna; Hoare, Anilei; Bravo, Denisse; Quest, Andrew. Cocultivation of *Helicobacter pylori* with *Porphyromonas gingivalis* and its effects on biofilm formation and hemagglutination of *P. gingivalis*. XXIV Congreso latinoamericano de microbiología ALAM, 13 al 16 de noviembre 2018, Santiago, Chile.

Rojas-Celis, Victoria; **Soto, Christopher**; Venegas, Darna; Bravo, Denisse; Quest Andrew Frederick Geoffery. *Porphyromonas gingivalis*- lipopolysaccharide O-antigen promotes expression of pro-inflammatory cytokines and migration of OKF6/TERT2 cells. Congreso Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas ICOD. 24 y 25 de enero 2019, Santiago, Chile.

Soto, Christopher; Olivera, Marcela; Yañez, Lucas; Pacheco, Martin; Venegas, Darna; Salinas, Daniela; Bravo, Denisse; Quest, Andrew. Co-cultivation of *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* affects biofilm formation and virulence of *P. gingivalis*. XXXI Congreso de la asociación internacional de investigación dental IADR, 29 y 30 de agosto 2019, Santiago, Chile.

- **Publicaciones**

Bravo D, Hoare A, **Soto C**, Valenzuela MA, Quest AF. *Helicobacter pylori* in human health and disease: Mechanisms for local gastric and systemic effects. World journal of gastroenterology **2018**; 24:3071-89.

Hoare A, **Soto C**, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. Mediators of inflammation **2019**; 2019:1029857.

Mendez KN, Hoare A, **Soto C**, et al. Variability in genomic and virulent properties of *Porphyromonas gingivalis* strains isolated from healthy and severe chronic periodontitis individuals. Frontiers in cellular and infection microbiology **2019**; 9:246.

Soto C, Rojas V, Yañez L, Hidalgo A, Olivera M, Pacheco M, Venegas D, Salinas D, Bravo B, Quest AF. *Porphyromonas gingivalis*-*Helicobacter pylori* co-incubation enhances *Porphyromonas gingivalis* virulence and increases migration of gingival epithelial cells. Journal of Oral Microbiology **2022** (en revisión).

ÍNDICE GENERAL

Índice General	i
Índice de Tablas	iii
Índice de Figuras	iv
Abreviaturas	vi
Resumen	viii
Summary	xii
1. Introducción	1
1.1. Características generales de la periodontitis	1
1.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> y su contribución al desarrollo de la periodontitis	4
1.3. <i>Porphyromonas gingivalis</i> y su asociación con otras bacterias de la biopelícula subgingival	8
1.4. <i>Helicobacter pylori</i> y su participación en la periodontitis	9
1.5. Liberación de citoquinas pro-inflamatorias asociadas a la progresión de la periodontitis	11
2. Hipótesis	15
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. Materiales y Métodos	16
4.1. Instrumentos y equipos.....	16
4.2. Materiales y reactivos	16
4.3. Cepas bacterianas	17
4.3.1. Condiciones de monocultivo bacteriano.....	17
4.3.2. Condiciones de co-cultivo bacteriano	18
4.3.3. Curvas de crecimiento	19
4.4. Cultivo Celular.....	19
4.4.1. Condiciones de cultivo celular	19
4.5. Protocolo de infección de células con <i>P. gingivalis</i>	20
4.6. Ensayo de invasión.....	21
4.7. Ensayo de formación de biopelícula.....	22
4.8. Ensayo de hemaglutinación.....	22
4.9. Ensayos de MTS para viabilidad celular	23
4.10. Ensayos de Azul Tripán para proliferación celular.....	23
4.11. Ensayos de migración	24
4.12. qPCR.....	24
4.13. Ensayo de actividad de gingipaínas.....	26
4.14. Western blot.....	26

4.15. Ensayo de Multiplex.....	27
4.16. <i>Knockdown</i> mediante transducción de shRNAs	27
4.17. Análisis Estadístico	28
5. Resultados	29
5.1. Identificar los cambios en la expresión de factores de virulencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en presencia de <i>Helicobacter pylori</i> , y determinar cómo afectan estos factores a su virulencia in vitro	29
5.2. Determinar el efecto de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en presencia o ausencia de <i>Helicobacter pylori</i> , sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias desde células epiteliales orales	40
5.3. Determinar el efecto de la infección por <i>Porphyromonas gingivalis</i> en presencia o ausencia de <i>Helicobacter pylori</i> , en la supervivencia, proliferación y migración de las células epiteliales gingivales	43
6. Discusión	57
7. Conclusión.....	68
8. Referencias.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de factores de virulencia de <i>P. gingivalis</i> , y sus efectos sobre células epiteliales gingivales	7
Tabla 2. Lista de partidores forward y reverse utilizados para cada gen analizado	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre estado de salud y periodontitis.....	1
Figura 2. Complejos bacterianos y patógenos “piedras angulares”	3
Figura 3. Activación de NF- κ B río abajo de TLR4.....	13
Figura 4. Curvas de crecimiento de co-cultivo y monocultivo para <i>H. pylori</i> y <i>P. gingivalis</i>	30
Figura 5. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> por 24 horas, aumenta la capacidad de <i>P. gingivalis</i> de formar biopelícula.....	32
Figura 6. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> , aumenta su capacidad invasiva a células epiteliales orales	34
Figura 7. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> , aumenta la hemaglutinación de glóbulos rojos a menores densidades bacterianas	35
Figura 8. <i>H. pylori</i> modula la expresión de algunos genes que codifican para factores de virulencia en <i>P. gingivalis</i> al ser co-incubadas por 24 h	37
Figura 9. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> silvestre y mutantes, aumenta su capacidad de formar biopelícula.....	38
Figura 10. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> , aumenta la actividad proteolítica de gingipaínas	39
Figura 11. Cambios en la expresión de mRNA de IL-8 y TNF α al co-cultivar <i>P. gingivalis</i> con <i>H. pylori</i>	41
Figura 12. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> , aumenta la concentración de IL-8 e TNF α en sobrenadantes de células infectadas.....	42
Figura 13. Cambios en la viabilidad de células epiteliales gingivales al infectar con <i>P. gingivalis</i> previamente co-cultivada o no con <i>H. pylori</i>	44
Figura 14. Cambios en el número de células epiteliales gingivales viables al infectar con <i>P. gingivalis</i> previamente co-cultivada o no con <i>H. pylori</i>	45
Figura 15. La infección con <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> silvestre y mutantes no provoca cambios en la sobrevivencia o el número de células epiteliales gingivales	46
Figura 16. <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> , aumenta la migración de células epiteliales orales infectadas.....	48

Figura 17. La incubación previa de <i>P. gingivalis</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> con el inhibidor de gingipaínas, disminuye su capacidad de promover la migración de células epiteliales orales infectadas	50
Figura 18. <i>P. gingivalis</i> Δ <i>pg1051</i> co-cultivada con <i>H. pylori</i> , no genera cambios en la migración de células epiteliales orales infectadas	52
Figura 19. Migración de células epiteliales gingivales infectadas con <i>H. pylori</i> y <i>P. gingivalis</i> co-cultivadas con <i>H. pylori</i> inactivada por calor	53
Figura 20. TLR4 participa en la migración de células epiteliales gingivales infectadas....	55
Figura 21. TLR4 participa en la migración de células epiteliales gingivales infectadas....	56
Figura 22. Modelo propuesto para el efecto del co-cultivo de <i>H. pylori</i> y <i>P. gingivalis</i> sobre la secreción de IL-8 y la migración de células epiteliales gingivales.....	67

ABREVIATURAS

AgO	Antígeno O
ANOVA	Análisis de Varianza
APS	Amonio Persulfato
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BHI	Infusión Corazón-Cerebro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nanómetros
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
GEC	Célula Epitelial Gingival
HPR	Peroxidasa de Rabanito
IL-8	Interleuquina 8
KSFM	Medio de crecimiento para Queratinocitos libre de Suero
LPS	Lipopolisacárido
MOI	Multiplicidad de Infección
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolium
NF-kB	Factor Nuclear Kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón Fosfato Salino
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RPM	Revolución por Minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino

TEMED	Trimetiletilendiamina
TLCK	Tosil-L-lisil-clorometano clorhidrico
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNFα	Factor Necrótico Tumoral alfa
TSA	Agar tríptico de soya
TSB	Caldo tríptico de soya
UFC	Unidad Formadora de Colonia

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad polimicrobiana caracterizada por una inflamación sostenida que puede provocar la pérdida de los tejidos de soporte de las piezas dentales y su etiología se relaciona con procesos disbióticos de la comunidad microbiana que coloniza la placa subgingival. Una de las principales bacterias asociadas a este proceso es *Porphyromonas gingivalis*.

En la biopelícula subgingival también se ha detectado la presencia de *Helicobacter pylori*, lo cual se ha asociado con mayor agresividad de la enfermedad y un aumento de patógenos periodontales, como *P. gingivalis*. Además, se determinó que la presencia de *H. pylori* en la biopelícula subgingival aumenta la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-8 y TNF α . Ambas citoquinas además se les conoce por activar al factor de transcripción NF- κ B. La activación y el aumento de la expresión de proteínas como TRAF6 y ERK1/2, sugieren que la activación de NF- κ B y el consecuente aumento en la expresión de citoquinas son producto de la activación de TLR4.

En la biopelícula subgingival, se ha descrito que la interacción entre otros patógenos periodontales, como *P. gingivalis* y *Treponema denticola*, aumenta la expresión de algunos factores de virulencia en *P. gingivalis*, como hemaglutinina A y la Fimbria, ambos relevantes en los procesos de adhesión e invasión intracelular, los cuales permiten a *P. gingivalis* adherirse a células del epitelio gingival e internalizarse en ellas para escapar del sistema inmune y proliferar.

Además, factores como gingipaínas, proteasas específicas de *P. gingivalis* tendrían un rol clave en procesos asociados a apoptosis y migración, procesos claves en la destrucción de los tejidos de soporte y formación del nicho ecológico donde la biopelícula subgingival coloniza.

Por otra parte, se ha reportado que *H. pylori* puede interactuar con bacterias de la cavidad oral, y se sugiere que sus adhesinas podrían vincularla con otras bacterias. De acuerdo con esos antecedentes se propone que *H. pylori* pueda promover la virulencia de *P. gingivalis* en la biopelícula subgingival generando cambios en los procesos de sobrevivencia, proliferación, migración y muerte celular. Por tanto, se plantea la siguiente hipótesis: **“*Helicobacter pylori* promueve la expresión de factores de virulencia en *Porphyromonas gingivalis*, aumentando la expresión de IL-8 y la migración celular en células epiteliales orales infectadas”**

Para resolver esta hipótesis, se co-incubó *P. gingivalis* y *H. pylori* en condiciones que permitan el crecimiento de ambas bacterias, y se determinó los efectos de la co-incubación sobre la virulencia de *P. gingivalis* y la expresión de factores de virulencia asociados a los procesos que promueven la progresión de la enfermedad (como hemaglutininas, gingipaínas y la ligasa del antígeno O del LPS) en *P. gingivalis*, mediante qPCR. Posteriormente se utilizó *P. gingivalis* previamente incubada con *H. pylori* para infectar células del epitelio gingival OKF6/TERT2 y determinar el perfil de citoquinas liberadas durante la infección,

mediante qPCR y Multiplex. Finalmente, se determinó los efectos de la infección por *P. gingivalis* previamente incubada con *H. pylori* sobre procesos asociados a la progresión de la periodontitis, como la sobrevivencia (mediante MTS), proliferación (mediante ensayos de azul tripán) y migración (mediante ensayos de transwell) de células epiteliales gingivales. Además, se evaluó el rol de TLR4 en los cambios observados en los procesos anteriormente descrito.

Los resultados obtenidos mostraron que es posible generar un medio de cultivo en donde *P. gingivalis* y *H. pylori* crezcan por 24 horas. Este co-cultivo bacteriano se realizó en todos los ensayos por 24 horas y luego *P. gingivalis* fue aislada para ser utilizada en los experimentos posteriores y evaluar los efectos del co-cultivo sobre su virulencia. Se observó que el co-cultivo de *P. gingivalis* y *H. pylori* promueven un aumento en la virulencia de *P. gingivalis* evaluado por un aumento en la capacidad de internalizarse en células del epitelio gingival OKF6/TERT2, un aumento en la capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos y un aumento en la capacidad de formación de biopelícula, comparado con *P. gingivalis* sin co-cultivar. El co-cultivo también promueve un aumento en la expresión de ARNm de los genes *rgpB* (gingipaína en arginina B), *hagA* y *hagC* (hemaglutininas A y C), y genes asociados a la virulencia de *P. gingivalis*.

También se vió que al infectar células OKF6/TERT2, *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* promueve la expresión del ARNm de las citoquinas proinflamatorias IL-8 y TNF α y un aumento en la expresión proteica de IL-8. Además, encontramos

un aumento de la migración de células epiteliales gingivales infectadas con *P. gingivalis*, el cual podría explicarse por el aumento en la expresión de las citoquinas y gingipaínas. Específicamente, se determinó que la inhibición de las gingipaínas por el inhibidor químico TLCK, no genera el aumento en migración de las células OKF6/TERT2 al ser infectadas por *P. gingivalis* co-cultivada.

Estos cambios en migración podrían estar regulados por la activación del receptor tipo toll TLR4, debido a que el *knock-down* de TLR4 mediante un *small hairpin RNA (shRNA)* contra TLR4 no promueve el aumento en migración observado.

En conclusión, en este trabajo hemos demostrado que existe una relación entre *P. gingivalis* y *H. pylori*, y que su interacción promueve cambios en la virulencia de *P. gingivalis*, promoviendo un aumento en la expresión de citoquinas y migración celular al infectar células epiteliales gingivales.

SUMMARY

Periodontitis is a polymicrobial disease characterized by sustained inflammation that can cause the loss of dental support tissues and its etiology is related to dysbiotic processes in the microbial community that colonizes the subgingival plaque. One of the main bacteria associated with this process is *Porphyromonas gingivalis*.

In the subgingival biofilm, the presence of *Helicobacter pylori* has also been detected, which has been associated with greater aggressiveness of the disease and an increase in periodontal pathogens, such as *P. gingivalis*. Furthermore, it was determined that the presence of *H. pylori* in the subgingival biofilm increases the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-8 and TNF α . Both cytokines are also known to activate the transcription factor NF- κ B. The activation and increased expression of proteins such as TRAF6 and ERK1 / 2 suggest that the activation of NF- κ B and the consequent increase in the expression of cytokines are a product of the activation of TLR4.

In the subgingival biofilm, it has been described that the interaction between other periodontal pathogens, such as *P. gingivalis* and *Treponema denticola*, increases the expression of some virulence factors in *P. gingivalis*, such as hemagglutinin A and Fimbria, both relevant in the processes of intracellular adhesion and invasion, which allow *P. gingivalis* to adhere to and internalize cells of the gingival epithelium to escape the immune system and proliferate. In addition, factors such

as gingipains, specific proteases of *P. gingivalis*, would play a key role in processes associated with apoptosis and migration, both important processes in the destruction of support tissues and the formation of the ecological niche where the subgingival biofilm colonizes.

On the other hand, it has been reported that *H. pylori* can interact with bacteria in the oral cavity, and it is suggested that its adhesins could link it with other bacteria. In accordance with these antecedents, it is proposed that *H. pylori* can promote the virulence of *P. gingivalis* in the subgingival biofilm, generating changes in the processes of survival, proliferation, migration and cell death. Therefore, the following hypothesis is proposed: "***Helicobacter pylori* promotes virulence factor expression in *Porphyromonas gingivalis*, increasing IL-8 expression, and cell migration in infected oral epithelial cells**"

To resolve this hypothesis, *P. gingivalis* and *H. pylori* were co-incubated under conditions that allow the growth of both bacteria, and the effects of co-incubation on the virulence of *P. gingivalis* and the expression of virulence factors were determined. associated with processes that promote disease progression (such as hemagglutinins, gingipains, and LPS O-antigen ligase (OAg)) in *P. gingivalis*, using qPCR. Subsequently, *P. gingivalis* previously incubated with *H. pylori* was used to infect OKF6 / TERT2 gingival epithelial cells and determine the profile of cytokines released during infection, using qPCR and Multiplex. Finally, the effects of infection by *P. gingivalis* previously incubated with *H. pylori* on processes

associated with the progression of periodontitis, such as survival (using MTS), proliferation (using trypan blue assays) and migration (using transwell migration assays) of gingival epithelial cells. In addition, the role of TLR4 in the changes observed in the processes described above was evaluated.

The results obtained showed that it is possible to generate a culture medium where *P. gingivalis* and *H. pylori* grow for 24 hours. This bacterial co-culture was carried out in all the tests for 24 hours and then *P. gingivalis* was isolated to be used in subsequent experiments and to evaluate the effects of the co-culture on its virulence. It was observed that the co-culture of *P. gingivalis* and *H. pylori* promote an increase in the virulence of *P. gingivalis* evaluated by an increase in the ability to internalize in OKF6 / TERT2 gingival epithelial cells, an increase in the ability to hemagglutinate red blood cells and an increase in biofilm formation capacity, compared to *P. gingivalis* without co-cultivation. Co-culture also promotes an increase in mRNA expression of the genes *rgpB* (gingipain in arginine B), *do* and *hagC* (hemagglutinins A and C), and genes associated with virulence of *P. gingivalis*.

It was also seen that when infecting OKF6 / TERT2 cells, *P. gingivalis* co-cultured with *H. pylori* promotes the mRNA expression of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF α and an increase in the protein expression of IL-8. Furthermore, we found an increase in the migration of gingival epithelial cells infected with *P. gingivalis*, which could be explained by the increase in the expression of cytokines

and gingipains. Specifically, it was determined that the inhibition of gingipains by the chemical inhibitor TLCK, does not generate the increase in migration of OKF6 / TERT2 cells when infected by co-cultured *P. gingivalis*.

These changes in migration could be regulated by the activation of the TLR4 toll-like receptor, since the knock-down of TLR4 by a small hairpin RNA (shRNA) against TLR4 does not promote the observed increase in migration.

In conclusion, in this work we have shown that there is an interaction between *P. gingivalis* and *H. pylori*, and that their interaction promotes changes in the virulence of *P. gingivalis*, promoting an increase in the expression of cytokines and cell migration when infecting gingival epithelial cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de la periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria caracterizada por el deterioro de los tejidos de soporte de las piezas dentales, tales como el tejido gingival, también conocida como encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar, deterioro que puede incluso causar la caída y pérdida de las piezas dentales [1]. La periodontitis tiene signos clínicos clásicos como lo son la generación placa, reducción del tejido gingival y la generación de bolsillos entre el diente y la encía con una profundidad mínima de 5 milímetros, conocidos como sacos periodontales (**Figura 1**).

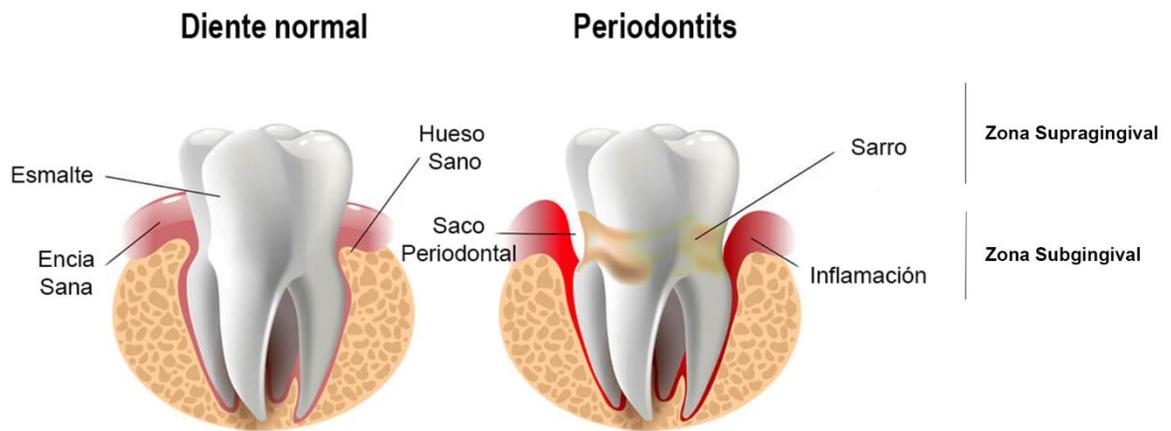


Figura 1. Comparación entre estado de salud y periodontitis. Se compara una pieza dental de un individuo periodontalmente sano y uno que posee periodontitis. Se observa que durante la periodontitis existe un deterioro o destrucción de tejidos claves en el soporte de las piezas dentales como la encía y el hueso. Modificado de <https://www.unidadmedica.com>

Actualmente, la periodontitis representa un gran problema nacional y mundial: la OMS calcula que un 35-50% de la población mundial adulta se encuentra afectada por esta patología [2, 3]. En estudios realizados en Chile, se ha observado que más del 90% de la población adulta presenta algún signo clínico asociado a esta patología y factores como el género, hábito de fumar y nivel educacional son indicadores de riesgos asociados a una peor progresión de la enfermedad [4].

A pesar de que la etiología de esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada, aún no se conocen completamente los factores que influyen en su origen y progresión. Hasta la fecha, la principal hipótesis y la más aceptada, es la que considera a la periodontitis como una enfermedad multifactorial que se inicia con la formación de una biopelícula bacteriana en la zona subgingival. Esta biopelícula está constituida por diferentes microorganismos, dentro de los cuales bacterias Gram positivo y negativo logran establecer asociaciones sinérgicas o competitivas que permiten el proceso de colonización bacteriana [5, 6].

La alteración del estado de equilibrio de la comunidad bacteriana subgingival mediante procesos disbióticos serían los responsables de gatillar el inicio de la enfermedad y producir una respuesta inmune inflamatoria exacerbada que finalmente genera el daño periodontal. Durante estos estados disbióticos, ciertas bacterias serían "piedras angulares" o agentes claves en el progreso de la enfermedad, evasión del sistema inmune innato y adquirido del hospedero y

transmisión horizontal de genes [7-9] (**Figura 2**). A pesar de que muchos investigadores han colaborado en aumentar el conocimiento sobre la aparición de la periodontitis, muchos de los factores moleculares que promueven el inicio de los procesos simbióticos siguen siendo desconocidos.

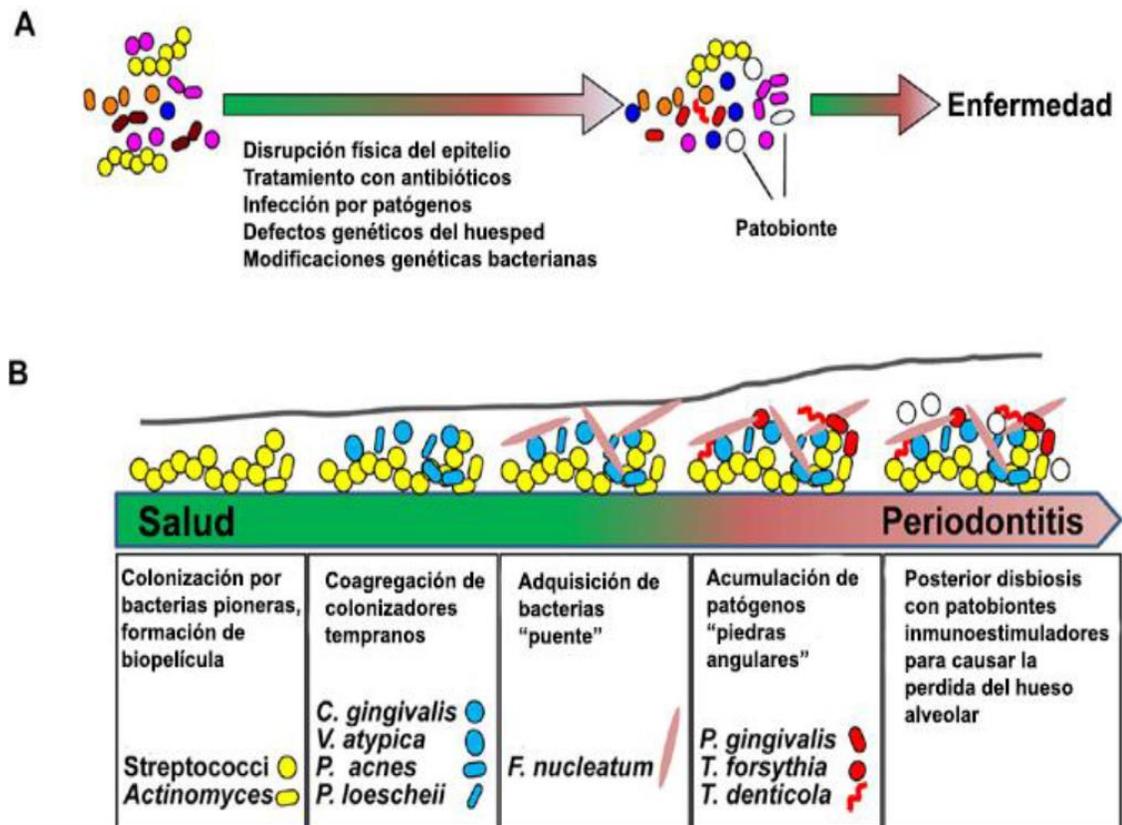


Figura 2. Complejos bacterianos y patógenos "piedras angulares". Los distintos complejos bacterianos se asocian a la biopelícula progresivamente. La llegada de los patógenos piedra angular, su acumulación y la suma de diferentes estímulos y factores permiten el paso de un estado de salud a un estado de enfermedad. Modificado de Crow, 2014.

El análisis taxonómico de la biopelícula subgingival ha permitido caracterizar a sus componentes e identificar a los principales agentes etiológicos de la enfermedad. *Porphyromonas gingivalis* es una de las bacterias más estudiadas y ha sido catalogada como un agente etiológico clave de la enfermedad, debido a que promueve la disbiosis en la comunidad subgingival y por los efectos que tiene sobre el sistema inmune y las células epiteliales gingivales para permitir su colonización e infección [10-12]. En el contexto chileno, *P. gingivalis* corresponde al periodontopatógeno de mayor prevalencia en aislados de pacientes con periodontitis crónica [13], principalmente asociado a sitios activos (donde hay destrucción del tejido de soporte), y es por tanto hasta la fecha la bacteria más relacionada con la progresión de la patología.

1.2. *Porphyromonas gingivalis* y su contribución al desarrollo de la periodontitis

P. gingivalis es un cocobacilo Gram negativo, anaerobio estricto, y una de las bacterias importantes que forman la biopelícula bacteriana [12]. Por sus características anaerobias es posible encontrarla con mayor facilidad en sacos periodontales con una profundidad al sondaje mayor o igual a 5 mm, aunque también puede encontrarse de forma menos frecuente en bolsillos periodontales de individuos periodontalmente sanos [13, 14].

P. gingivalis posee múltiples factores de virulencia, entre los cuales destacan moléculas de adhesión como fimbrias, hemaglutinina A, moléculas de membrana

externa como el lipopolisacárido (LPS), presencia de cápsula (antígeno K) y enzimas proteolíticas conocidas como gingipaínas [15, 16].

Factores como hemaglutinina A y la subunidad mayor de la fimbria (FimA) le permiten a *P. gingivalis* reconocer, adherir e internalizarse en células no fagocíticas (como las células del tejido gingival), donde es capaz de subsistir mediante la evasión del sistema inmune y facilitar una infección crónica característica en el desarrollo de la periodontitis [17-23]. Proteínas receptoras de las células de epitelio gingival, como integrina $\alpha 5\beta 1$, son capaces de reconocer a estos factores de virulencia gatillando una reestructuración del citoesqueleto (microtúbulos) que junto a la proteína Caveolina-1 y Dinamina 2 permiten la internalización de la bacteria [23]. Además, FimA estaría asociado a un aumento en la secreción de TNF α , citoquina asociada a un aumento en la apoptosis de células epiteliales gingivales [24].

Las gingipaínas Kgp (proteasa en lisina), RgpA y RgpB (proteasas en arginina) han sido asociadas fuertemente a la liberación de citoquinas en células epiteliales. Estas citoquinas serían relevantes en el proceso de inflamación de la periodontitis y clave en su progresión [25]. También se ha observado que la sobreactivación de las gingipaínas promueven procesos migratorios, importantes en la generación del saco periodontal en los inicios de la periodontitis [26-28]. Sin embargo, otros estudios proponen que estas gingipaínas podrían estar asociadas

a un aumento en la migración debido a la degradación de proteínas asociadas a adhesión celular, como la quinasa de adhesión focal FAK y las cateninas [29].

Las gingipaínas también han sido vinculadas con la degradación de interleuquinas secretadas al espacio extracelular como IL-1 β , IL-6 y TNF- α para evitar el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de colonización [30], y la activación de la vía PI3K/Akt promoviendo un aumento en la migración de las células infectadas lo que conlleva a la recesión de las encías y la generación del saco periodontal [28, 31]. También se ha visto que las gingipaínas pueden degradar interleuquinas en el espacio citosólico como IL-1 β , o degradar proteínas relacionadas al proceso de apoptosis como caspasa 1 y BID [32, 33]. Por tanto, se especula que estas proteasas podrían tener importancia en la regulación de otros procesos celulares como proliferación y arresto celular, transformación epitelio mesénquima y migración. Aunque probablemente sea así, todavía se necesita de mucha más investigación para comprender la complejidad de estos procesos.

Por otro lado, el LPS es una molécula compuesta de 3 dominios estructurales definidos: Lípido A, Core de oligosacáridos y Antígeno O. Esta molécula no solo sería clave en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, sino que presentaría modificaciones, como acetilaciones y fosforilaciones, que pueden generar hasta 5 estructuras distintas de lípido A [34]. Estas formas químicamente modificadas pueden evadir el reconocimiento por el sistema inmune y contribuir a la

persistencia de la bacteria en la enfermedad. Además, trabajos realizados en nuestro laboratorio han vinculado a la ligasa del antígeno O del LPS, unas de las enzimas que participan en la biosíntesis del LPS uniendo el lípido A con el antígeno O previo a ser exportada a la membrana bacteriana, con la modulación del proceso de apoptosis en células epiteliales [35]. Estos procesos apoptóticos estarían vinculados a la pérdida de los tejidos de soporte, como el tejido gingival, importante en la progresión de la enfermedad [36].

En conjunto, los factores de virulencia mencionados promoverían no solo la sobrevivencia de la bacteria en el ambiente subgingival, sino que además serían relevantes en la progresión de la periodontitis (**Tabla 1**).

Factor de Virulencia	Gen	Efectos sobre Células Epiteliales Gingivales
Gingipaínas	<i>rgpA, rgpB</i> (Arginina Proteasas)	Promueve la liberación de citoquinas pro-inflamatorias [25]
	<i>kgp</i> (Lisina Proteasa)	Mutantes en gingipaínas promueven un fenotipo migratorio [28]
Lipopolisacárido	<i>pg1051</i> (Ligasa del Antígeno O)	Mutantes en <i>pg1051</i> promueven la inhibición de la apoptosis [35]
Hemaglutininas	<i>hagA, hagB, hagC</i>	Importante en los procesos de adhesión, invasión y formación de biopelícula [20, 21]

Tabla 1. Genes de factores de virulencia de *P. gingivalis*, y sus efectos sobre células epiteliales gingivales.

1.3. *Porphyromonas gingivalis* y su asociación con otras bacterias de la biopelícula subgingival

P. gingivalis también tiene la capacidad de coagregar con otras bacterias de la biopelícula oral. Ha sido demostrada su capacidad de vincularse con *Fusobacterium nucleatum* [37], bacteria que posee una gran cantidad de adhesinas y receptores que la hacen capaz de unirse a muchos patógenos periodontales y es importante en la progresión de la enfermedad periodontal. Además, factores de virulencia de *P. gingivalis* como Hemaglutinina A y la fimbria, no solo serían importantes en el proceso de invasión a células epiteliales, si no que les permitiría la asociación a otros microorganismos en la biopelícula subgingival. Hemaglutinina A específicamente, ha sido vinculada con la unión a otras bacterias como *Treponema denticola*, otra bacteria relevante en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Estudios previos han determinado que la coagregación de ambas bacterias promueve una interacción simbiótica en donde existe un intercambio de nutrientes y un aumento en algunos factores de virulencia de *P. gingivalis* involucrados en la adhesión como la misma Hemaglutinina A y gingipaínas. Estos cambios podrían explicar en parte la progresión de la enfermedad periodontal [38-40].

Los estudios que han analizado la biopelícula bacteriana oral en búsqueda de los posibles cambios que se producen en el desarrollo de la enfermedad periodontal

o que potencian los procesos disbióticos generados por patógenos periodontales como *P. gingivalis*, han encontrado que no solo factores como la falta de higiene o el consumo de tabaco estarían afectando a la comunidad bacteriana [41], sino que además, la colonización de otro tipo de bacterias podrían estar asociadas a los procesos disbióticos.

1.4. *Helicobacter pylori* y su participación en la periodontitis

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo microaerófilico, capaz de colonizar y sobrevivir en el ambiente estomacal debido a diferentes capacidades, tales como sensor el gradiente de pH y moverse a zonas menos ácidas, o neutralizando el ácido circundante con grandes cantidades de ureasa, enzima que convierte urea en amoníaco y agua. Esta bacteria ha sido asociada a la aparición de patologías como úlceras gastroduodenales, o adenocarcinomas gástricos [42]. Mas aún, un estudio reciente reveló una relación entre la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral y la progresión de la periodontitis al encontrar que la presencia oral de *H. pylori* se vinculaba en los pacientes con un peor estado periodontal [43]. Este vínculo ha permitido especular sobre una posible participación de *H. pylori* en la progresión de la enfermedad periodontal e incluso su capacidad de interactuar con otras bacterias de la biopelícula.

Basados en la colonización de *H. pylori* en la cavidad oral, diferentes investigaciones han intentado determinar un posible rol de esta bacteria en la periodontitis. Muchos estudios clínicos han vinculado un deterioro de la salud oral

al presentar la colonización de *H. pylori* en la cavidad oral [44, 45], incluso se ha demostrado que el tratamiento contra *H. pylori* promueve un mejor pronóstico al momento de tratar la periodontitis del paciente. Estos factores son importantes ya que sugieren una participación de *H. pylori* en el estado de salud periodontal, o incluso postulan a *H. pylori* como uno de los factores que promueven los procesos disbióticos en la cavidad oral que permiten la progresión de la periodontitis.

Se ha determinado que *H. pylori*, al igual que *P. gingivalis*, puede coagregar y vincularse con *F. nucleatum* mediante adhesinas específicas que posee esta última [46]. En este trabajo, los autores estiman que los receptores que posee *H. pylori*, y la gran cantidad de bacterias que existen en la cavidad oral, permiten la coagregación con otros microorganismos. Nuevos estudios han determinado que al igual que *P. gingivalis*, *H. pylori* posee proteínas “adhesinas” que promueven la hemaglutinación al igual que HagA. Estas proteínas (conocidas como HpaA, SabA y BabA) podrían ser importantes en la interacción de *H. pylori* con otras especies de la biopelícula oral y podrían influir en la virulencia de estas últimas y además promover la progresión de la periodontitis [47-49].

Hasta la fecha, no existen trabajos que resuelvan otras interacciones de *H. pylori* con otros miembros de la biopelícula subgingival y menos los mecanismos que *H. pylori* utiliza para promover un peor estado periodontal. Como una bacteria altamente adhesiva y debido a las especulaciones de otros investigadores sobre

la capacidad de interactuar con otras bacterias por la gran cantidad de adhesinas que *H. pylori* posee, analizar estas interacciones son claves para dilucidar la participación de *H. pylori* en la progresión de la periodontitis. Esta aseveración toma mas fuerza aun cuando observamos que además de vincularse en los pacientes con un peor estado periodontal, la presencia de *H. pylori* se correlaciona con una mayor colonización por patógenos periodontales, tales como *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, y la liberación mayor de moléculas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF α [43], citoquinas claves en el desarrollo de la periodontitis.

1.5. Liberación de citoquinas pro-inflamatorias asociadas a la progresión de la periodontitis

Algunos estudios han asociado fuertemente a citoquinas como IL-8, TNF α , IL-1 β y IL-6 con el inicio y progresión de la periodontitis ya que están involucradas en el aumento de la migración de células del sistema inmune hacia el sitio afectado, degradación de la matriz extracelular, aumento de la liberación de citoquinas y quimoquinas y la resorción del hueso alveolar [24, 43, 50-52]. No obstante, estas citoquinas también tienen efectos sobre otros procesos biológicos como la angiogénesis, proliferación celular, apoptosis y el desarrollo tumoral [26, 43]. IL-8 y TNF α son las citoquinas que más han sido relacionadas con la progresión de la enfermedad debido a sus efectos en procesos como apoptosis y migración.

En este contexto, TNF α ha sido asociado fuertemente con el aumento de la apoptosis en células epiteliales gingivales, una mayor permeabilidad de la capa de células epiteliales y el consecuente aumento de la invasión de los patógenos periodontales. También se le atribuye una mayor expresión de RANKL por parte de las células epiteliales gingivales, lo cual se asociaría a la formación de osteoclastos y la resorción del hueso alveolar [50, 53]. FimA, subunidad mayor de la fimbria, sería relevante en la expresión de esta citoquina inducida por *P. gingivalis* [24].

Por su parte, IL-8 promueve la migración de células epiteliales gingivales unidas al esmalte, promoviendo la formación o el aumento de profundidad de los sacos periodontales, sitios predilectos para el crecimiento de patógenos periodontales anaerobios. Además, aumenta la síntesis de DNA e inhibe el proceso de apoptosis mediante una disminución del clivaje de caspasa 3 [26].

Ambas citoquinas, TNF α e IL-8, pueden ver inducida su expresión por la activación del factor NF- κ B (también conocido como p50/p65) [54-56]. Además, se ha reportado que la infección de células del ligamento periodontal y del epitelio gingival con *P. gingivalis* promueve la activación de NF- κ B y un aumento en la secreción de IL-8 y TNF α [51, 57, 58]. La activación y el aumento de la expresión de proteínas como TRAF6 y ERK1/2, sugieren que la activación de NF- κ B y el consecuente aumento en la expresión de citoquinas son producto de la activación de TLR4, el cual específicamente reconocería factores de virulencia como la

fimbria y el LPS promoviendo cascadas de señalización intracelular que activarían TRAF6. Esta proteína promueve a su vez la fosforilación y degradación del factor I κ B, y como consecuencia la liberación del complejo p50-p65, el cual finalmente puede translocarse al núcleo y promover la activación de genes relacionados a la sobrevivencia celular [52, 57, 58] (**Figura 3**).

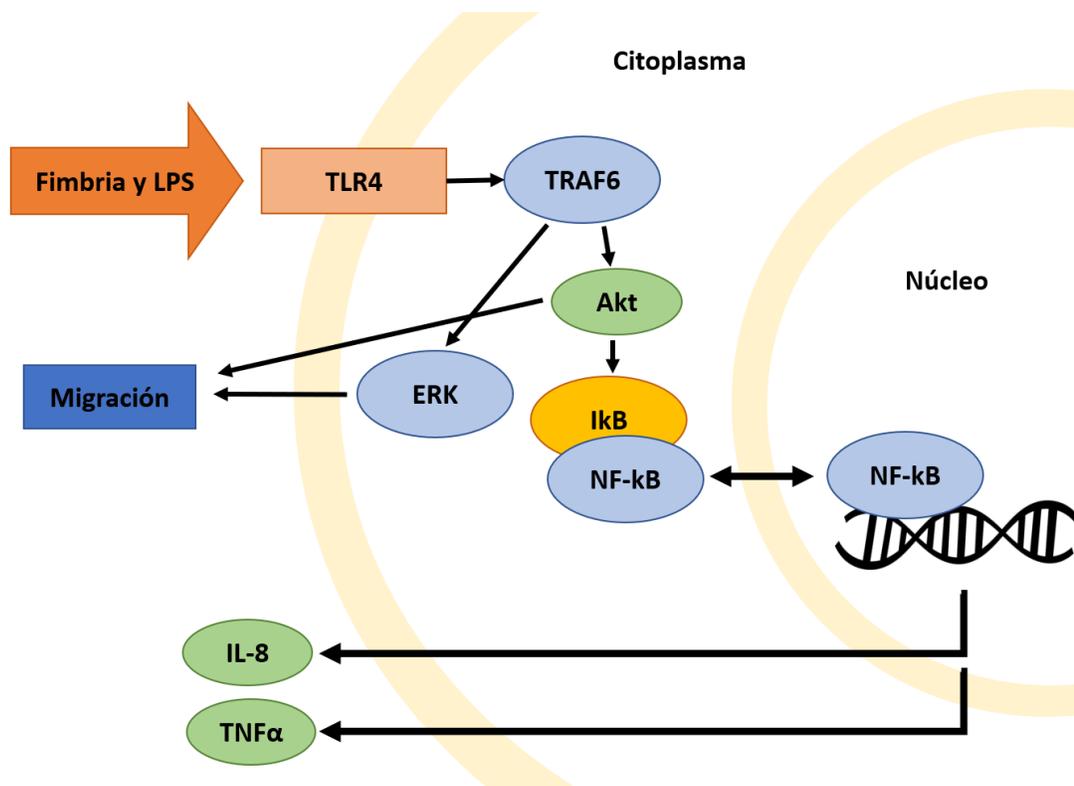


Figura 3. Activación de NF- κ B por TLR4. La activación de TLR4 por fimbria y LPS bacteriano promueve la activación de ERK1/2 y NF- κ B. Este último se transloca al núcleo y promueve la expresión de citoquinas como TNF α e IL-8.

Por otra parte, se ha descrito que la activación de ERK1/2 aumenta la migración y la producción de IL-8 en células del epitelio gingival [59, 60]. Si bien se sabe que estas citoquinas estarían involucradas en la progresión de la periodontitis, se desconoce si *H. pylori* modula a través de su interacción con *P. gingivalis* el patrón de expresión y secreción de estas citoquinas.

En resumen, la periodontitis es una enfermedad de amplio espectro que afecta a millones de personas a nivel mundial, la cual ocurre debido a procesos disbióticos en la cavidad oral que permiten la colonización y desarrollo de patógenos periodontales como *P. gingivalis*. También se ha sugerido que *H. pylori* está involucrada en la progresión y severidad de la enfermedad debido a su presencia e interacción con ciertos miembros de la biopelícula oral. Otros trabajos además han determinado que *H. pylori* promueve la liberación de citoquinas y el aumento de patógenos periodontales en la cavidad oral, sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurren estos procesos aún no han sido dilucidados.

En este proyecto se propone que la interacción entre *H. pylori* con *P. gingivalis* promueve un aumento en la expresión de la virulencia de esta última, promoviendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (como IL-8 y TNF α), las cuales generan cambios en los procesos de migración y proliferación de células epiteliales gingivales infectadas que se vincularían con los signos y síntomas característicos de la periodontitis.

2. HIPÓTESIS

“*Helicobacter pylori* promueve la expresión de factores de virulencia en *Porphyromonas gingivalis*, aumentando la expresión de IL-8 y la migración celular en células epiteliales orales infectadas”

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si *H. pylori* promueve la expresión de factores de virulencia de *P. gingivalis* y como esto se relaciona con cambios en la producción de citoquinas pro-inflamatorias en células epiteliales orales y la progresión de la periodontitis.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Identificar cambios en la expresión de factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis* en presencia de *Helicobacter pylori*, y determinar cómo afectan estos factores a su virulencia *in vitro*.

3.2.2. Determinar el efecto de *Porphyromonas gingivalis* en presencia o ausencia de *Helicobacter pylori*, sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias desde células epiteliales orales.

3.3.3. Determinar el efecto de la infección por *Porphyromonas gingivalis* en presencia o ausencia de *Helicobacter pylori*, en la supervivencia, proliferación y migración de las células epiteliales gingivales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Instrumentos y equipos

Los instrumentos y equipos utilizados fueron: gabinete de seguridad biológica Nuair LabGard ES425; incubador de CO₂ Nuair Autoflow 8500; incubador de CO₂ LabTech LCO-265AI; baño termostático Memmert WNB7; microscopio invertido Zeiss Primo Vert; cámara de Neubauer Marienfeld; centrífuga Eppendorf 5417R; centrífuga Hettich Rotina 35R; espectrofotómetro Dynamica Halo RB-10; equipo de electroforesis Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell; fuente de poder Bio-Rad PowerPac™ Basic Power Supply; lector de placas BioTek ELx800; Cell Sorter FACSaria III; microscopio fluorescencia ZEISS modelo es LSM700, equipo de qPCR StepOnePlus.

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)*; tripsina-EDTA de *Hyclone (Logan, UT, EEUU)*; reactivo TRIzol de *Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU)*; medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero (KSFM), pituitaria de bovino, factor de crecimiento epidermal y tampón fosfato salino (PBS) de *Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU)*; hemina de *Calbiochem (San Diego, CA, EEUU)*; placas de cultivo de 60 mm, placas de cultivo de 24 y 96 pocillos y pipetas serológicas de *BD Falcon™ (Franklin Lakes, NJ, EEUU)*; menadiona, metronidazol, y saponina de *Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO,*

EEUU); Tris y Azul Tripan, de *Winkler Ltda. (Santiago, Chile)*; penicilina-estreptomina de *Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd. (Kibbutz Beit-Haemek, Israel)*; Pierce BCA protein assay kit de *ThermoFisher (Waltham, MA, EEUU)*.

4.3. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de referencia de *P. gingivalis*: W50 (ATCC 53978). Además, se utilizó una mutante isogénica generada por intercambio alélico en el gen de la ligasa del antígeno O ($\Delta pg1051$). Estas cepas fueron cordialmente donadas por el Dr. Joe Aduse Opoku, Centro de Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Instituto Blizzard, Reino Unido.

Para *H. pylori*, se utilizó la cepa de referencia ATCC 26695. Además, se utilizaron las mutantes isogénicas en los genes de los factores de virulencia de *H. pylori*, *cagA*, *vacA*, *ggt*, y el cluster *ure* que codifican para CagA, VacA, gamaglutamil transferasa y Ureasa. Estas cepas fueron generadas por el Dr. Manuel Valenzuela en el laboratorio de comunicaciones celulares del Dr. Andrew Quest.

4.3.1. Condiciones de monocultivo bacteriano

Todas las cepas de *P. gingivalis* se sembraron en placas de agar sangre suplementado con hemina y menadiona al 1% y se cultivaron en anaerobiosis a 37°C durante 7 días hasta que las colonias presentaron pigmentación negra. Solo en el caso de la cepa mutante $\Delta Pg1051$, las placas se suplementaron con eritromicina 5 µg/mL. Para crecer *P. gingivalis* en medio de cultivo líquido, se

seleccionó colonias aisladas desde la placa de agar sangre y se resuspendieron en un tubo de ensayo con 10 mL de BHI suplementado con hemina y menadiona al 1%. El tubo se incubó en anaerobiosis durante aproximadamente 24 h, hasta que las bacterias alcanzaron la fase exponencial de crecimiento (DO_{600} de 0,6-0,8). Para generar un ambiente libre de oxígeno se utilizó jarras de anaerobiosis en las que se mantuvo los cultivos junto a un generador de anaerobiosis (AnaeroGen), el cual genera un ambiente compuesto de 9-13% de dióxido de carbono y menos del 1% de oxígeno.

Todas las cepas de *H. pylori* se cultivaron en medio TSA, suplementado con VITOX 2%, Dent 0,5% y Suero Equino 5% y se cultivaron por 16 a 20 h a 37°C, 5% CO₂ en agitación orbital. Para crecer *H. pylori* en medio de cultivo líquido, se seleccionó colonias aisladas desde la placa de TSA y se resuspendieron en un matraz con 25mL de BHI suplementado con 2%, Dent 0,5% y Suero Equino 5% y se incubó por 16 a 20 h a 37°C, 5% CO₂ en agitación orbital.

4.3.2 Condiciones de co-cultivo bacteriano

Para generar un co-cultivo para *P. gingivalis* y *H. pylori*, se utilizó una cantidad de bacteria inicial en razón 1:1, considerando que para *P. gingivalis*, una $DO_{600}=0,6$ contiene aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL, y para *H. pylori*, una $DO_{600}=0,4$ contiene aproximadamente 3×10^8 bacterias/mL. Ambas bacterias se incubaron en un medio líquido compuesto por BHI suplementado con hemina y menadiona 1%, suero equino 5% y VITOX 2% a 37°C en anaerobiosis.

Para aislar *P. gingivalis* desde el co-cultivo para los ensayos de infección, se inocularon 100 µl del co-cultivo de 24 h en medio líquido fresco de *P. gingivalis* (medio líquido BHI suplementado con hemina y menadiona 1%, en anaerobiosis, 37°C) y se incubó anaerómicamente durante 24 h más.

4.3.3. Curvas de Crecimiento

Se midió la densidad óptica a 600nm de cada cepa bacteriana crecida en cultivos y las soluciones se ajustaron para contener 1×10^4 bacterias. Cada dilución se sembró en 1 mL del medio líquido fresco correspondiente y se incubó según lo requerido durante 24 h a 37°C. Luego, se tomó un inóculo de 100 µl de cada cultivo, se prepararon diluciones y se plaqueó 10 µL de cada dilución en una placa de agar sangre. Las placas se incubaron a 37°C en anaerobiosis durante 5 días. Pasado este tiempo, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada dilución.

4.4. Cultivo celular

Se utilizó la línea de células de epitelio gingival OKF6/TERT2 (Dickson et al., 2000), facilitada por la Dra. Anna Dongari-Bagtzoglou, Escuela de Medicina Dental, Universidad de Connecticut, EEUU.

4.4.1. Condiciones de cultivo celular

Las células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂ ambiental en medio de crecimiento para queratinocitos libre de suero

(KSFM), suplementado con pituitaria de bovino 25 µg/mL, factor de crecimiento epidermal (EGF) 0,2 ng/mL, cloruro de calcio 0,3 M y penicilina/estreptomicina.

Las células se mantuvieron entre 30 a 80% de confluencia. Para traspasar las células o generar monocapas para ensayos de infección, las monocapas se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), se agregó 1 mL de tripsina-EDTA y se incubaron durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregó 5 mL de PBS para diluir la tripsina y las células se soltaron mecánicamente de la placa mediante pipeteo o utilizando un raspador para células. Esta suspensión se centrifugó a 890 x g durante 10 min, para luego retirar el sobrenadante y resuspender las células en 1 mL de medio sin antibiótico. Finalmente, se tomó una alícuota de 10 µL y se mezcló en una relación de 1:10 con solución Azul Tripán. Finalmente, se realizó el conteo células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido para ser sembrada a los valores necesarios para cada experimento.

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

Se sembró 25.000 células por pocillo en placas multipocillos de 96 para ensayos de invasión y MTS y 100.000 células por pocillo en placa multipocillos de 24 para Azul tripán y migración. En ambos casos, las placas se incubaron a 37°C en 5% CO₂ durante 24 h con medio KSFM suplementado como se describió en 4.4.1, pero sin los antibióticos penicilina/estreptomicina. Luego de este tiempo, se lavaron para ser infectadas con *P. gingivalis*. Por otra parte, se preparó un cultivo

líquido de *P. gingivalis* sembrando en medio BHI suplementado y se incubó durante aproximadamente 24 h a 37°C en anaerobiosis llegando a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Luego, se tomó el volumen necesario para infectar las células epiteliales a una multiplicidad de infección (MOI) de 100, considerando que una DO₆₀₀=0,6 contiene aproximadamente 1x10⁸ bacterias/mL. Para cada ensayo, se tomó una alícuota del inoculo inicial y se plaqueó en agar sangre suplementado con hemina y menadiona para determinar la MOI real. Finalmente, se completó el volumen del pocillo con KSFM suplementado, pero sin antibióticos (100 µl finales en placa de 96 pocillos y 500 µL en placa de 24 pocillos). Como control negativo, se utilizó células sin infectar. Este momento se denomina “tiempo cero”.

Las células se infectaron durante 90 min a 37°C y 5% de CO₂. Luego, fueron lavadas con PBS y se les restituyó el medio celular suplementado con gentamicina 300 µg/mL y metronidazol 200 µg/mL por la duración de los tiempos de post-invasión, para eliminar las bacterias que no hayan ingresado a las células. Este es considerado el "tiempo 0" y desde este punto las células se incubaron por 2 h para los ensayos de migración y 24 h para los ensayos de invasión, MTS, western blot, qPCR y azul tripán.

4.6. Ensayo de invasión

Se sembró 25.000 células por pocillo en una placa multipocillos de 96. Las células se infectaron con las diferentes cepas de *P. gingivalis* según lo descrito en el punto 4.5.

Pasado 90 min de infección, las células se lavaron con PBS y se agregó 100 µL de saponina 1% diluida en agua destilada nanopura. Las células se incubaron por 10 min a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, se tomó el sobrenadante, se prepararon diluciones y se plaqueó 10 µL de cada dilución en una placa de agar sangre. Las placas se incubaron a 37°C en anaerobiosis durante 5 días. Pasado este tiempo, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada dilución.

4.7. Ensayos de formación de biopelícula

Los cultivos líquidos de *P. gingivalis* se diluyeron a una densidad óptica de 0,125 a 600 nm y se añadieron a una placa de fondo plano de 96 pocillos en medio BHI suplementado con TSB al 1% y luego se incubaron anaeróticamente a 37°C durante 48 h. Luego, el medio se retiró mediante inversión suave, los pocillos se lavaron dos veces con agua destilada y la placa se dejó secar. Después de 1 h, se agregaron 100 µL de safranina al 0,1% a cada pocillo y se dejó teñir durante 15 min, seguido de dos lavados en agua destilada. Finalmente, la safranina en la biopelícula se eluyó con 100 µL de etanol al 95% durante 5 min y se midió la absorbancia de la elución a 490 nm.

4.8. Ensayos de hemaglutinación

Se centrifugó 1 mL de sangre de caballo desfibrinada a 3.400 x g durante 5 min. El sedimento resultante (glóbulos rojos) se lavó 3 veces y luego se diluyó en PBS hasta una concentración final del 1%. En paralelo, se cultivó *P. gingivalis* y se ajustó a una densidad óptica de 2,0 a 600 nm. Luego, se agregaron 200 µL de la

dilución bacteriana a una placa multipocillos de fondo redondo de 96. Después de eso, cada dilución de bacteria se diluyó en serie, tomando 100 μ L del inóculo y mezclando con 100 μ L de PBS (dilución 1: 2). Este paso se repitió hasta alcanzar la dilución 1:64. Finalmente, cada pocillo se mezcló con un volumen igual de eritrocitos de oveja al 1% y se incubó a 37°C durante 3 h o hasta observar hemaglutinación.

4.9. Ensayos de MTS para viabilidad celular

Se sembró 25.000 células por pocillo en una placa multipocillos de 96. Las células se infectaron con las diferentes cepas de *P. gingivalis* según lo descrito en el punto 4.5. Luego de 24 h post infección, se agregó a las células el reactivo MTS preparado según las indicaciones del fabricante (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Madison, Wisconsin, EEUU; *Promega*) para luego incubar durante 1 h a 37°C. Finalmente, se midió la placa por espectrofotometría en un lector de placas a 490nm.

4.10. Ensayos de Azul Tripán para viabilidad celular

Se sembró 100.000 células por pocillo en una placa multipocillos de 24. Las células se infectaron con las diferentes cepas de *P. gingivalis* según lo descrito en el punto 4.5. Luego de 24 h post infección, las células fueron lavadas y resuspendidas mediante 100 μ L de Tripsina-EDTA y pipeteo. Se tomó 10 μ L del sobrenadante para diluir a razón 1:10 con una solución de Azul Tripán y se realizó

el conteo células viables utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio invertido.

4.11. Ensayo de migración

Se sembró 100.000 por pocillos en una placa multipocillos de 24. Las células se infectaron con las diferentes cepas de *P. gingivalis* según lo descrito en el punto 4.5. Para los ensayos de inhibición de gingipaínas, el cultivo bacteriano se incubó previamente con 50 y 100 μ M de Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (TLCK) durante 30 minutos antes de la infección. Luego de los 90 min de infección, las células fueron lavadas y resuspendidas en medio sin suero y se agregaron a la parte superior de cada cámara de Boyden (Transwell Costar, 6,5 mm de diámetro, tamaño de poro de 8 μ m), previamente recubiertas con 2 μ g/ml de fibronectina. Además, se añadió medio con suero fetal bovino (SFB) al 5% a la cámara inferior para estimular la migración. Después de 2 h post infección, se retiraron los insertos, se lavaron suavemente con PBS y las células que migraron al lado inferior de los insertos se tiñeron con violeta cristal al 0,1% en etanol al 2% y se contaron en un microscopio invertido. Para los ensayos de migración con *H. pylori* inactivada por calor, el inóculo preparado a MOI 100 se incubó previamente a 65 °C durante 2 h y luego se agregó a las monocapas celulares.

4.12. qPCR

Para extraer ARNm de células OKF6/TERT2, se sembró 100.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos múltiples y las células se infectaron con las

cepas correspondientes según lo descrito en el punto 4.5. Para extraer ARNm desde *P. gingivalis*, los cultivos bacterianos se incubaron anaeróbicamente hasta una densidad óptica de 0,7 a 600nm.

El ARNm total se extrajo en TRIzol/cloroformo y luego el ADNc se sintetizó usando un kit de transcripción inversa siguiendo las recomendaciones del fabricante (SuperScrip III, Invitrogen). A continuación, se midió la expresión de ARNm de los genes correspondientes a los factores de virulencia a estudiar mediante qPCR. Se añadieron 100 ng del ADNc amplificado en cada reacción de qPCR usando SYBR Green (KAPA SYBR Fast qPCR, KAPA Biosystems). Los partidores utilizados se resumen en la **tabla 2**.

Gen	Partidor Forward	Partidor Reverse
16S <i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	ACTGTTAGCAACTACCGATGT
rgpB	AGCTCAGGTGCCTACCTTCA	AGCGATCAGCACATCCTTCT
rgpA	CGAATGTCAGATTGCTCGAA	AAGCGTAGGCATCCCTTTTT
kgp	AAGCAAATTCAGGCAGGAGA	GTTGGCACGTACATCGTTTG
PG_1051	TGGCATCGAGCTTCTGTATG	ACAAGGCGACCAAACCATAG
hagA	CCAAAGGTTACGGTTCCTGA	ATCCGAGGGTTTCTTCCAGT
hagC	TTTGCCAAGAATGTGCTGAC	GTCGAGGGCTATGACCTGAG
beta-actina	AAATCGTGCGTGACATTAAGC	CCGATCCACACGGAGTACTT
IL-8	GCTTTCTGATGGAAGAGAGC	GGCACAGTGGAACAAGGACT
TNFα	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA

Tabla 2. Lista de partidores *forward* y *reverse* utilizados para cada gen analizado.

4.13. Ensayo de actividad de gingipainas

Los cultivos de *P. gingivalis* se crecieron anaeróbicamente hasta una densidad óptica de 0,7 a 600nm, y luego se centrifugaron a 23.000 x g durante 5 min y el sobrenadante se retiró y se guardó a 37°C. El *pellet* bacteriano se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente repitiendo este proceso dos veces. Después de eso, se añadió una solución que contiene 1 ml de N-a-benzoil-DL-arginina (BApNA) (0,2 mM) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Ditiotreititol 0,2 mM a los *pellet* bacterianos resuspendidos y los sobrenadantes obtenidos inicialmente. La solución se incubó a 37°C durante 30 a 60 min de reacción y finalmente se midió la absorbancia de cada solución a 405 nm.

4.14. Western Blot

Se cultivaron células OKF6/TERT2 hasta una confluencia del 70% y se infectaron con las cepas correspondientes según lo descrito en el punto 4.5. Luego de 24 h post infección, las células se lavaron y resuspendieron en PBS helado que contenía PMSF 100 µM, Na₃VO₄ 1 M y NaF 1 M. A continuación, las células se centrifugaron a 3.000 x g durante 2 min a 4°C y los sedimentos se lisaron mediante sonicación en tampón de extracción que contenía HEPES 20 mM pH 7,4, NP-40 al 0,1% y SDS al 0,1%, PMSF 100 µM, Na₃VO₄ 1 M y 1 M NaF. Las concentraciones de proteínas en los extractos se determinaron utilizando el kit de BCA. Las muestras de proteína se separaron mediante SDS-PAGE (50 µg / carril), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon en PBS

que contenía leche al 5% y se incubaron *overnight* a 4°C con anti-TLR4 (1: 5000) (Santa Cruz Biotechnologies) y anticuerpos anti- β -actina (1: 5000) (Sigma-Aldrich) diluidos en PBS 5% de leche y 1% de Tween-20. Se utilizaron anticuerpos IgG anti-ratón de cabra acoplados a HRP (Bio-Rad) para detectar los primeros anticuerpos unidos por EZ-ECL. Las bandas de proteínas se cuantificaron mediante análisis densitométrico utilizando el software ImageJ 1.34s.

4.15. Ensayo de Multiplex

Se cultivaron células OKF6/TERT2 hasta una confluencia del 70% y se infectaron con las cepas correspondientes según lo descrito en el punto 4.5. Luego de 24 h post infección, el sobrenadante de cada condición fue recuperado. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g por 5 min a 4°C y luego a 1.000 x g por 10 min y se guardó el sobrenadante. Finalmente, los sobrenadantes fueron analizados con el kit Miliplex MAP Multiplex Assay según el procedimiento descrito por el fabricante y los resultados se obtuvieron utilizando el software Magpix Luminex platform (Austin, TX, EEUU, *Luminex; X-Map Technology*).

4.16 Knockdown mediante transducción de *shRNAs*

Se sembraron 300.000 células HEK293T en una placa de 6 pocillos y se mantuvieron a 37°C por 24 h. Las células se lavaron y se les agregó una mezcla de lipofectamina 3000, las partículas virales sh1, VSVg y PPAX y el *shTLR4* y *shScramble* como control. Luego de 72 horas, se recolectó el sobrenadante de

esas células y se le agrego a una placa previamente sembrada con 300.000 células OKF6/TERT2. Se esperó 24 h y las células fueron lavadas y seleccionadas por el tiempo necesario con 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de puromicina.

4.17. Análisis Estadístico

Todos los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA (ANOVA de una vía). Para analizar las diferencias significativas, se utilizó el post-test de comparación múltiple de Dunnett. Todos los resultados obtenidos corresponden a tres o más replicados biológicos. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Los datos de qPCR se analizaron utilizando el software MxPro qPCR (Agilent) y se obtuvo la cuantificación relativa de cada gen analizado utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (como gen de referencia, se usó ARNr 16S de *P. gingivalis* como control procarionota y beta-actina como control eucariota). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software PRISM (versión 8.0; GraphPad).

5. RESULTADOS

5.1. Identificar los cambios en la expresión de factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis* en presencia de *Helicobacter pylori*, y determinar cómo afectan estos factores a su virulencia *in vitro*.

Se ha demostrado que *H. pylori* puede adherirse a bacterias de la biopelícula gingival como *F. nucleatum* [46], pero hasta la fecha se desconoce si *H. pylori* puede interactuar de alguna forma con *P. gingivalis*. Para poder evaluar una eventual interacción entre ambas bacterias, se estandarizó un medio de cultivo capaz de cultivar *P. gingivalis* y *H. pylori* en co-cultivo (Medio *Brain-Heart Infusion* BHI, suplementado con VITOX, hemina y menadiona, 37°C en anaerobiosis y agitación orbital). El co-cultivo permitió el crecimiento de ambas bacterias por 48 h, debido a que no se encontraron unidades formadoras de colonias (UFC) viables de *H. pylori* después a las 72 h (**Figura 4A**, curva negra y roja).

Se realizaron controles en microaerofilia y anaerobiosis para *H. pylori* (**Figura 4A**, curva verde y azul) con el fin de ver el efecto de la ausencia de oxígeno y descartar un efecto antimicrobiano de *P. gingivalis*. Los controles realizados sugieren que es la anaerobiosis la responsable de la muerte de *H. pylori* después de 24 horas, debido a la similaridad en los patrones de las curvas de crecimiento (**Figura 4A**, curva roja y azul). Es necesario recalcar que el co-cultivo no genera cambios en las curvas de crecimiento de *P. gingivalis* cuando se compara con su monocultivo (**Figura 4A**, curva negra y naranja).

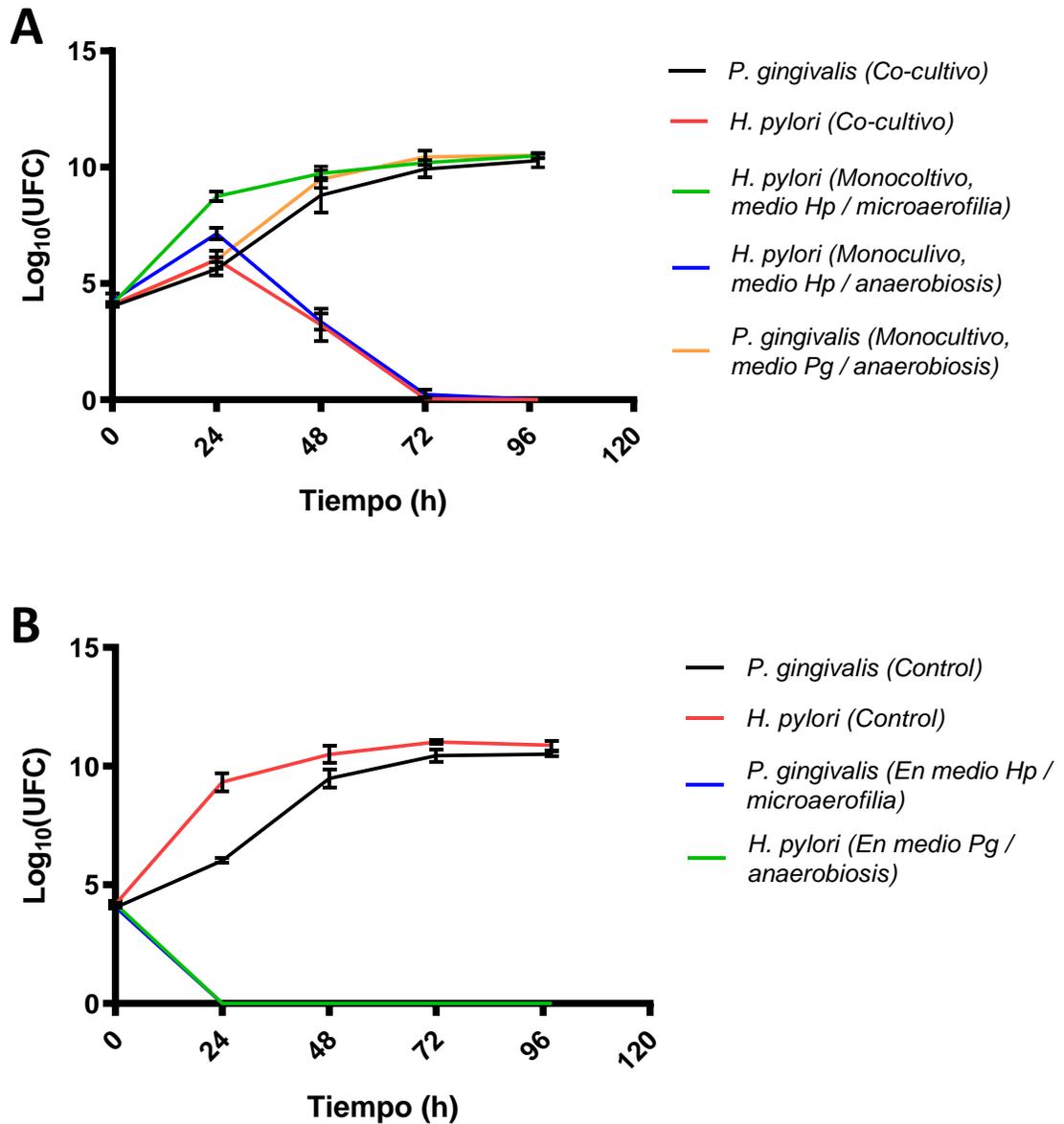


Figura 4. Curvas de crecimiento de co-cultivo y monocultivo para *H. pylori* y *P. gingivalis*. (A) Curvas de crecimiento de *H. pylori* 26695 y *P. gingivalis* W50 cultivados individualmente (monocultivo) o en co-cultivo. Los monocultivos de *H. pylori* desarrollados en microaerofilia o anaerobiosis se muestran como controles. (B) Curvas de crecimiento de *P. gingivalis* y *H. pylori* en condiciones normales (control) y cuando se cultivó cada uno en las condiciones utilizadas para la otra bacteria. n=3.

Además de estos controles, se realizaron curvas de crecimiento de monocultivo de cada bacteria en su medio de crecimiento normal (control) y el medio de la otra bacteria. Podemos observar que *P. gingivalis* no crece en las condiciones de crecimiento de *H. pylori* y viceversa, *H. pylori* no crece en las condiciones de cultivo de *P. gingivalis* (**Figura 4B**). Este resultado nos permite utilizar el medio de cultivo de *P. gingivalis* para aislar a esta bacteria desde el co-cultivo luego de 24 horas de crecimiento y descartar la presencia de *H. pylori* en los inóculos utilizados para realizar los diversos ensayos que comprenden esta tesis.

Sabemos que existen bacterias como *T. denticola* y *P. gingivalis* que pueden interactuar promoviendo el aumento en la virulencia de *P. gingivalis* [38]. Para evaluar si *H. pylori* tiene el mismo efecto sobre *P. gingivalis*, se aisló *P. gingivalis* a las 24 horas desde el co-cultivo, y el cultivo resultante se utilizó para realizar ensayos de formación de biopelícula, hemaglutinación e invasión de células epiteliales orales con el fin de detectar posibles cambios en la virulencia de *P. gingivalis*. Se utilizó como control a *P. gingivalis* cultivada en ausencia de *H. pylori*.

Los ensayos de formación de biopelícula se basan en la capacidad innata de las bacterias de formar polisacáridos para generar una película que permita su adhesión a superficies o mecanismos de defensa al microambiente. Para esto, se creció *P. gingivalis* en el medio previamente descrito suplementado con 1% caldo triptona en una placa de 96 pocillos. Pasadas 48 h, la placa se lavó

cuidadosamente con agua destilada, y la biopelícula resultante fue teñida con safranina 0,1%. La safranina retenida fue diluida con etanol 95% para finalmente medir espectrofotométricamente la absorbancia en el sobrenadante resultante a 490 nm. En la **Figura 5** se observa que la cantidad de safranina retenida por *P. gingivalis* previamente co-cultivada con *H. pylori* durante 24 h aumentó 2.1 veces con respecto al control sin co-cultivar. Esto se traduce en que el co-cultivo con *H. pylori* aumenta en más de 2 veces la capacidad de *P. gingivalis* de formar biopelícula.

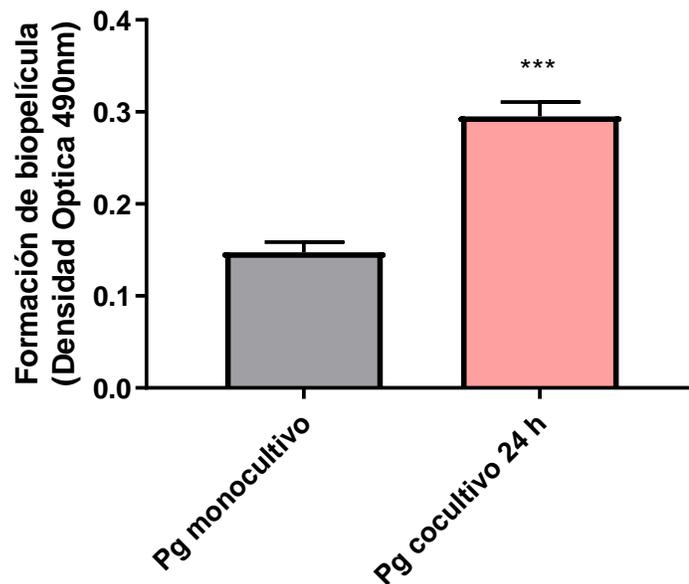


Figura 5. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 horas, aumenta la capacidad de *P. gingivalis* de formar biopelícula. Se muestra la densidad óptica a 490nm del colorante (safranina) retenido por las biopelículas formadas (por 48 h) por *P. gingivalis* sin co-cultivar o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 h. One-way ANOVA, post-test Dunett. *** indica diferencias significativas de $p < 0,001$. $n=3$.

Para los ensayos de invasión, se cultivó *P. gingivalis* durante 1 a 2 días hasta conseguir una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6-0,7. Se infectaron monocapas de células epiteliales gingivales (GECs) OKF6/TERT2 en una placa de 96 pocillos con *P. gingivalis* a una multiplicidad de infección de 100 durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se reemplazó el medio de cultivo con medio suplementado con gentamicina y metronidazol (300 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente) para eliminar las bacterias extracelulares que no fueron capaces de ingresar a las células. Las células fueron incubadas con este medio durante 2 h, a continuación, las monocapas fueron lavadas con PBS y lisadas con Saponina 1%. Las bacterias liberadas del medio intracelular fueron diluidas y sembradas en Agar sangre suplementado con hemina-menadiona. Las placas se incubaron en anaerobiosis durante 3 a 5 días para hacer un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). La **Figura 6** nos muestra que la capacidad invasiva de *P. gingivalis* aumentó más de 3 veces cuando se co-cultiva con *H. pylori* durante 24 h comparado con el control.

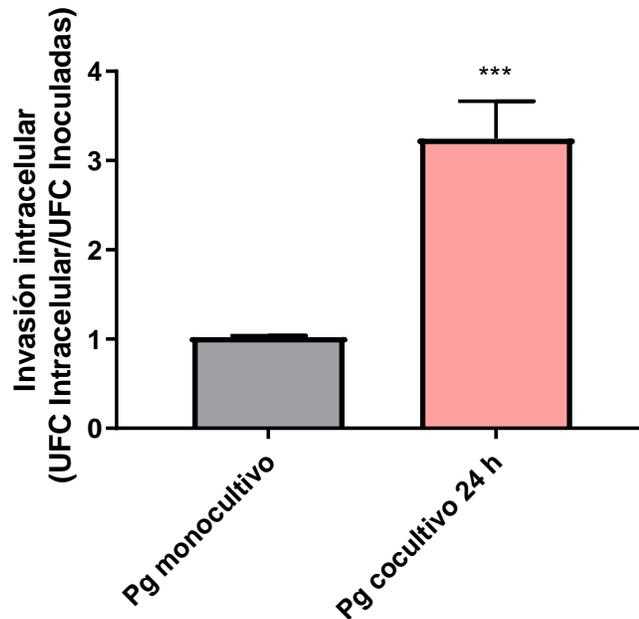


Figura 6. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori*, aumenta su capacidad invasiva a células epiteliales orales. Se muestran los niveles de invasión, expresados en la razón UFC obtenidas intracelularmente/UFC inoculadas, de *P. gingivalis* control o co-cultivada con *H. pylori* por 24 h, en células epiteliales gingivales OKF6/TERT2. Se asignó arbitrariamente el valor 1 a la invasión de *Pg* control. One-way ANOVA, post-test Dunett. *** de $p < 0,001$. $n=3$

Los ensayos de hemaglutinación miden la capacidad de virus y bacterias de aglutinar glóbulos rojos o la pérdida de esta aglutinación bajo la adición de inhibidores. Para esto se preparó diluciones seriadas de *P. gingivalis* desde una densidad óptica a 600 nm entre 1,5 y 2. Posteriormente, se adicionó una solución de globulos rojos de sangre de equino, previamente lavados con PBS, para obtener una concentración final de 1%. Las muestras se mantuvieron en las condiciones normales de crecimiento por 2 a 3 h.

Los resultados mostraron que co-cultivar *P. gingivalis* con *H. pylori* por 24 h aumenta la capacidad de *P. gingivalis* de hemaglutinar glóbulos rojos comparado con la bacteria sin co-cultivar (**Figura 7**). Se observa en la figura que *P. gingivalis* control, logra hemaglutinar los glóbulos rojos hasta en la dilución 1:4, mientras que *P. gingivalis* previamente co-cultivada lo hace en una dilución más alta (1:8). Por tanto, la forma co-cultivada necesita de menor concentración bacteriana para promover la hemaglutinación de glóbulos rojos.

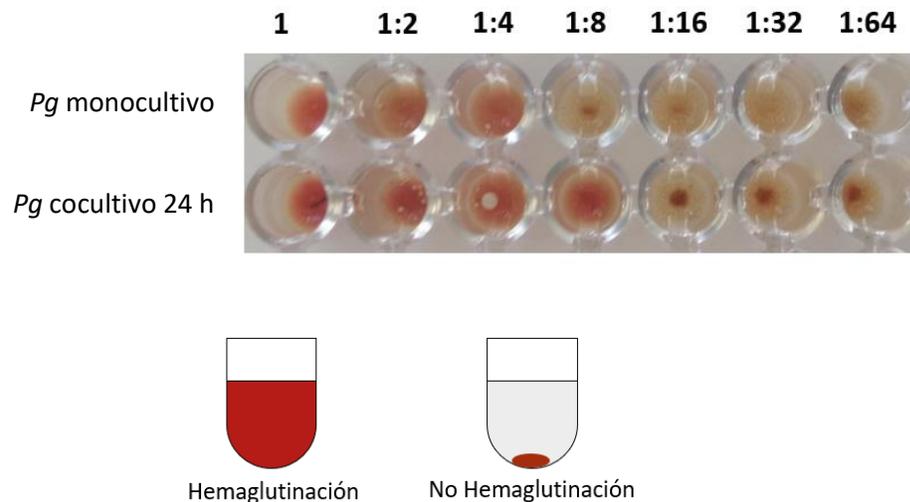


Figura 7. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori*, aumenta la hemaglutinación de glóbulos rojos a menores densidades bacterianas. Se observa figura representativa (n=3) de hemaglutinaciones con *P. gingivalis* control o co-cultivada con *H. pylori* por 24 h. Los valores observados en la parte superior corresponden a la razón de las diluciones realizadas a partir de una densidad óptica bacteriana a 600 nm igual a 1,5 (correspondiente al valor inicial de 1). En la parte inferior, figura esquemática de cómo se observa un pocillo hemaglutinado y uno no hemaglutinado.

Para vincular estos resultados con cambios en los factores de virulencia de *P. gingivalis*, se realizaron ensayos de qPCR para determinar si el co-cultivo con *H. pylori* produce cambios en la expresión de los genes mencionados en la **Tabla 1** y que son relevantes en la progresión de la enfermedad periodontal.

Para realizar el qPCR, primero se extrajo RNA desde 3ml de cultivo bacteriano mediante método TRIzol/ cloroformo/isopropanol. Se trató la muestra con DNAsa para eliminar DNA contaminante y se retrotranscribió a cDNA, proceso que fue controlado mediante geles de agarosa al 2%. Finalmente, se realizó el qPCR con Tm= 58°C para todos los pares de partidores diseñados, previo control de la amplificación mediante PCR convencional de gradiente.

Los resultados permiten observar que los genes *hagA*, *hagC* para las hemaglutininas A y C y el gen *rgpB* para gingipaína en arginina B aumentan su expresión relativa al co-cultivarse con *H. pylori* por 24 h (**Figura 8**). Específicamente, la expresión relativa de *hagA* aumentó 5 veces, la de *hagC* 4,6 veces, y *rgpB* aumentó 5,3 veces. Por otro lado, los genes *rgpA*, *kgp* y *pg_1051* no cambiaron su expresión.

Para determinar si existe algún factor de virulencia en *H. pylori* responsable de los cambios generados sobre *P. gingivalis*, se utilizaron cepas mutantes en 4 factores de virulencia importantes en los principales mecanismos de virulencia utilizados y escritos para *H. pylori* en la cavidad gástrica (VacA, CagA, Gamma Glutamyl Transpeptidasa (GGT) y Ureasa) y se realizaron los co-cultivos con *P.*

gingivalis. Posteriormente, se aisló *P. gingivalis* del co-cultivo y se realizó ensayos de formación de biopelícula. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las mutantes en *H. pylori* lograron cambiar el fenotipo visto con la cepa silvestre de *H. pylori* al ser co-cultivada con *P. gingivalis* (Figura 9).

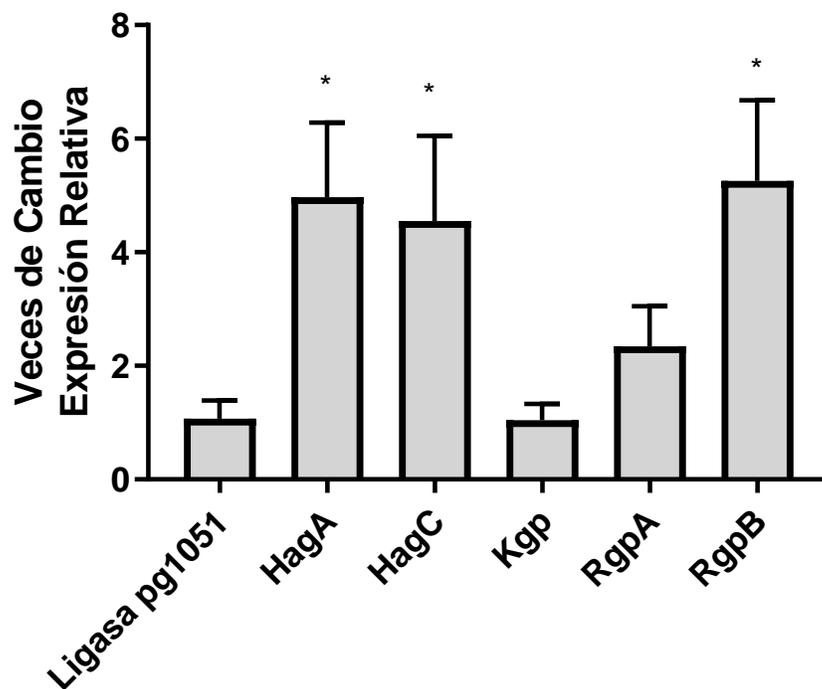


Figura 8. *H. pylori* modula la expresión de algunos genes que codifican para factores de virulencia en *P. gingivalis* al ser co-incubadas por 24 h. Se muestran las veces de cambio de la expresión relativa ($\Delta\Delta Ct$) de los genes de virulencia de *P. gingivalis*. Se compara la expresión de *P. gingivalis* co-cultivada y *P. gingivalis* control. Se utilizó una región específica en 16S rRNA de *P. gingivalis* como gen de referencia. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$

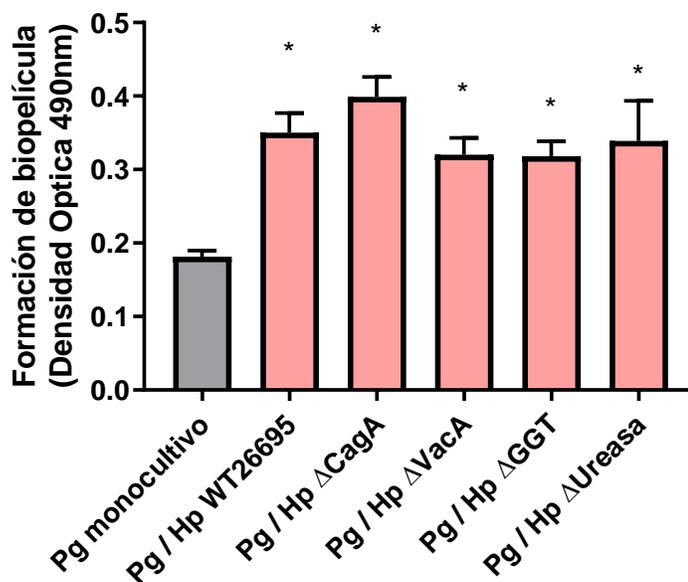


Figura 9. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* silvestre y mutantes, aumenta su capacidad de formar biopelícula. Se muestra la densidad óptica a 490nm del colorante (safranina) retenido por las biopelículas formadas (por 48 h) por *P. gingivalis* sin co-cultivar o *P. gingivalis* co-cultivada por 24 h con *H. pylori* silvestre y con mutantes de *H. pylori* que carecen de CagA, VacA, GGT o la Ureasa. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$

El aumento en el mRNA de la gingipaína RgpB es muy interesante ya que se ha asociado la actividad de las gingipaínas con cambios en migración y apoptosis [26-28]. Debido a esto, se analizó si el aumento en el mRNA se correlacionaba con un aumento en la actividad proteolítica de estas enzimas. Por lo mismo, se realizó un ensayo de actividad colorimétrico asociado al compuesto específico 5- α -benzoyl-DL-arginina 4-nitroanilide monohydrochloride. Además, y para asociar los posibles resultados a la actividad de las gingipaínas, utilizamos un inhibidor

irreversible de las gingipaínas conocido como TLCK, el cual ya ha sido utilizado en la literatura para la inhibición de gingipaínas [61].

Se puede ver que existe un aumento de la actividad de las gingipaínas de *P. gingivalis* monocultivada. Esta actividad aumentó aún más en *P. gingivalis* previamente co-cultivada con *H. pylori* por 24 h. Al utilizar TLCK, ambas actividades disminuyeron a niveles similares al observado en el control sin bacterias (**Figura 10**).

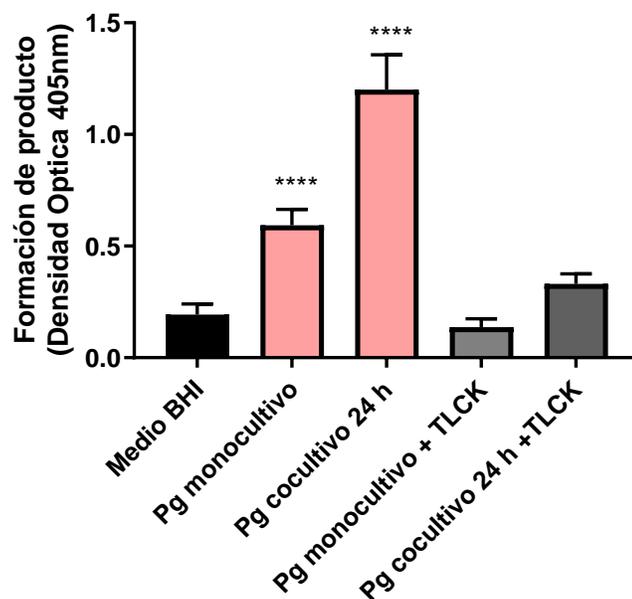


Figura 10. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori*, aumenta la proteólisis de gingipaínas. Se observa la densidad óptica a 405nm de ensayo colorimétrico para medir actividad proteolítica de gingipaínas provenientes de *P. gingivalis* monocultivada control o co-cultivada con *H. pylori* por 24 h. One-way ANOVA, post-test Dunett. *** indica diferencias significativas de $p < 0,001$ con respecto a medio BHI. $n=3$.

5.2. Determinar el efecto de *Porphyromonas gingivalis* en presencia o ausencia de *Helicobacter pylori*, sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias desde células epiteliales orales.

Sabemos que *P. gingivalis* puede promover la expresión de interleuquinas como IL-8 y TNF α , las cuales están asociadas a la progresión de la periodontitis [26, 50, 54-56]. Para evaluar si el co-cultivo de *H. pylori* y *P. gingivalis* promueve la expresión de mRNA mensajero de IL-8 y TNF α , analizamos la expresión de estos genes mediante qPCR. Para esto, se infectaron células del epitelio gingival OKF6/TERT2 por 24 h con *P. gingivalis* monocultivada y con *P. gingivalis* previamente co-cultivada con *H. pylori* por 24 h, se extrajo el mRNA y se analizó mediante qPCR. Tanto el mRNA de IL-8 y TNF α se vió aumentado en 1,8 y 1,7 veces, respectivamente al infectar las células con *P. gingivalis* monocultivada. Sin embargo, la expresión de ambos mRNA aumentó aún más en 3,1 y 3,4 veces, respectivamente, cuando se infectó con *P. gingivalis* previamente co-cultivada con *H. pylori* por 24 h (**Figura 11**).

Para evaluar si este aumento en la expresión se traducía en un aumento en la secreción de estas citoquinas, el sobrenadante de las células infectadas con *P. gingivalis* monocultivada y co-cultivada fue utilizado para realizar una medición multiplex de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF α . Se puede observar que IL-8 aumenta su concentración en el sobrenadante al infectar las células con *P. gingivalis* monocultivada (1,7 veces), sin embargo, cuando se infecta con *P.*

gingivalis previamente co-cultivada con *H. pylori* por 24hrs, IL-8 disminuye su concentración (**Figura 12**). En el caso de TNF α , no existen cambios significativos en la concentración de la citoquina al infectar las células en ambas condiciones.

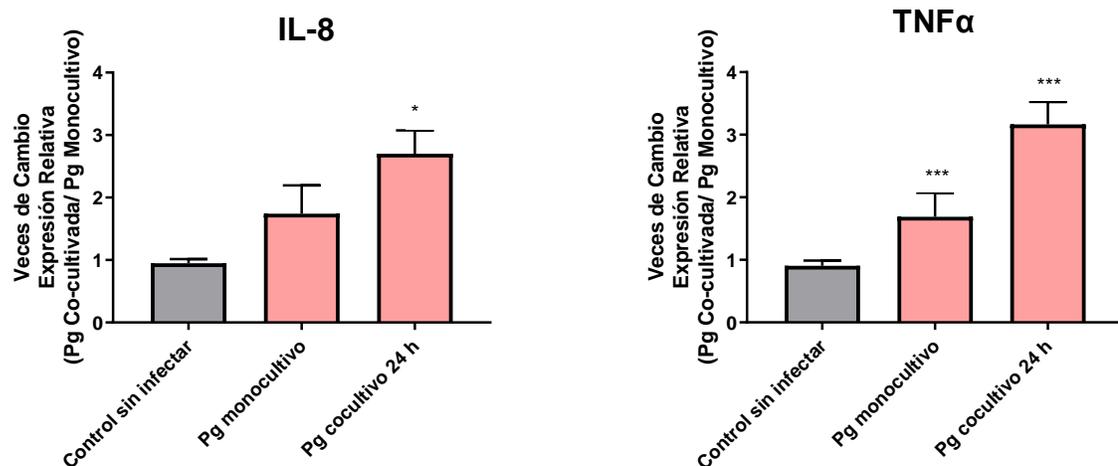


Figura 11. Cambios en la expresión de mRNA de IL-8 y TNF α al co-cultivar *P. gingivalis* con *H. pylori*. Se muestran las veces de cambio de la expresión relativa ($\Delta\Delta Ct$) de los genes para IL-8 y TNF α de células infectadas con *P. gingivalis*. Se compara la expresión de células OKF6/TERT2 infectadas con *P. gingivalis* co-cultivada o *P. gingivalis* monocultivada contra células sin infectar (Ctrl). Se utilizó GAPDH como gen de referencia. One-way ANOVA, post-test Dunett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$

Se ha descrito que las gingipaínas pueden degradar citoquinas secretadas al espacio extracelular. Debido a que observamos un aumento en el mRNA de RgpB, la disminución de IL-8 observada aquí al infectar con *P. gingivalis* co-cultivada, podría deberse a la mayor actividad en las gingipaínas reportada anteriormente (ver **Figura 10**).

Debido a esto, es que se midieron las citoquinas en el sobrenadante en presencia de TLCK para inhibir el posible efecto de las gingipaínas en la degradación de citoquinas. En la **Figura 12**, podemos ver que la adición de TLCK provoca una disminución de la presencia de IL-8 en los sobrenadantes de células infectadas con *P. gingivalis* monocultivada con respecto a la infección sin TLCK. Lo contrario ocurre con las células infectadas con *P. gingivalis* co-cultivada al observarse un aumento de la presencia de IL-8 con respecto a la infección sin TLCK. De la misma forma que antes TNF α no mostró diferencias significativas al agregar TLCK.

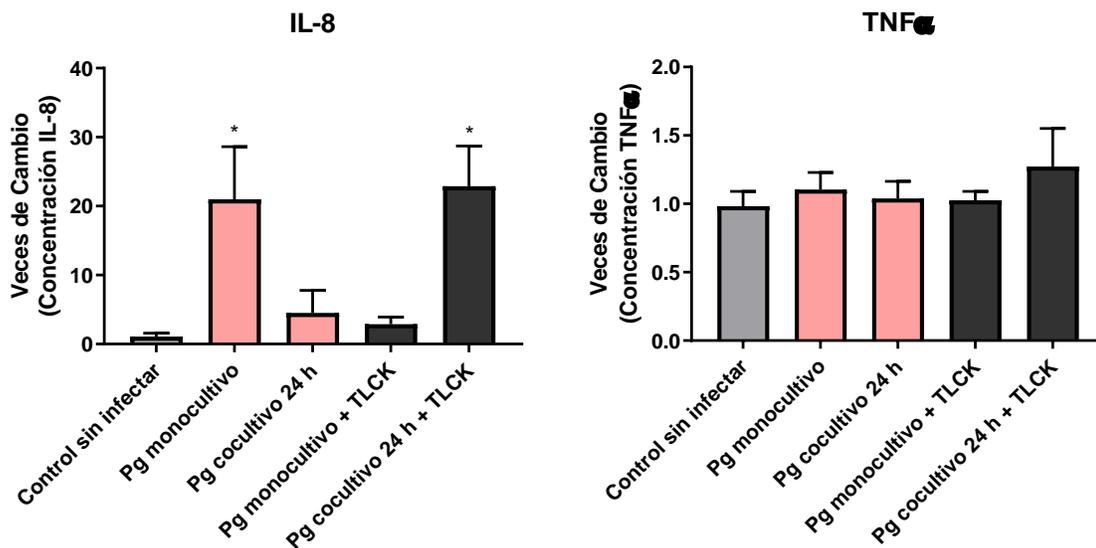


Figura 12. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori*, aumenta la concentración de IL-8 e TNF α en sobrenadantes de células infectadas. Se muestran las veces de cambio de la concentración de IL-8 y TNF α en el sobrenadante de células OKF6/TERT2 infectadas con *P. gingivalis* co-cultivada o *P. gingivalis* monocultivada. Se compara las veces de cambio con respecto a las células sin infectar = 1. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n = 4$

5.3. Determinar el efecto de la infección por *Porphyromonas gingivalis* en presencia o ausencia de *Helicobacter pylori*, en la sobrevivencia, proliferación y migración de las células epiteliales gingivales.

Se ha reportado que IL-8 y TNF α aumentan la migración de diferentes líneas celulares [26, 62, 63]. Como observamos un aumento en el mRNA de ambas citoquinas y una mayor secreción de IL-8, decidimos evaluar la viabilidad, proliferación y migración de las células del epitelio gingival OKF6/TERT2 infectadas con *P. gingivalis* en monocultivo y co-cultivo. En primer lugar, se realizaron ensayos de viabilidad mediante ensayos de MTS. Esta técnica se basa en la adición de un compuesto capaz de ser reducido por enzimas propias de la mitocondria (oxidoreductasas) transformándose en un compuesto coloreado llamado formazán, el cual puede ser medido mediante espectrofotometría. Una célula viable posee actividad mitocondrial y, por ende se observa una mayor formación del producto coloreado cuando hay más células vivas; no así cuando hay células muertas o en proceso de apoptosis, las cuales presentan una menor o nula actividad mitocondrial traduciéndose en una menor coloración.

Para realizar el ensayo se infectaron células OKF6/TERT2 (o GECs del inglés) en una placa de 96 pocillos con *P. gingivalis* (sin co-cultivar o previamente co-cultivada) a multiplicidad de infección 100, durante 90 minutos. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 24 h en medio KSFM con una mezcla de antibióticos (gentamicina y metronidazol) para eliminar las bacterias

extracelulares que no fueron capaces de ingresar a las células. Finalmente se agregó el compuesto MTS durante 1 h y se midió la absorbancia a 490 nm.

Los resultados mostraron que las células infectadas con *P. gingivalis* control (sin co-cultivar), aumentaron significativamente la sobrevivencia celular. Sin embargo, al infectar con *P. gingivalis* previamente co-cultivada con *H. pylori* por 24 h, no se observaron cambios comparado con las células sin infectar (**Figura 13**).

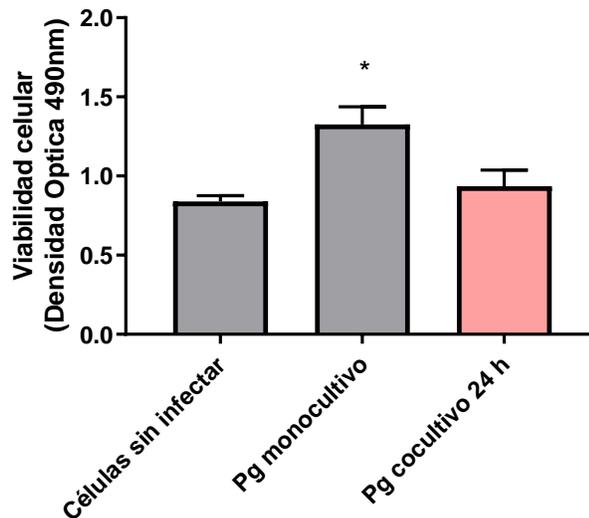


Figura 13. Cambios en la viabilidad de células epiteliales gingivales al infectar con *P. gingivalis* previamente co-cultivada o no con *H. pylori*. Densidad óptica a 490 nm para determinar viabilidad de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2, luego de ser infectadas con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 h, mediante ensayos de MTS. Se observan los resultados luego de 24 h post-infección. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$

Complementariamente, se realizaron ensayos de Azul Tripán para determinar la viabilidad de las células. Este compuesto es capaz de internalizarse en las células que no son viables debido a que presentan una mayor permeabilidad de la membrana plasmática, pudiendo determinar mediante el conteo de las células teñidas el porcentaje de viabilidad celular. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por el ensayo de MTS, viendo un aumento en el número de células al infectar con la cepa control, y no viendo cambios cuando se infecta con *P. gingivalis* co-cultivada (**Figura 14**).

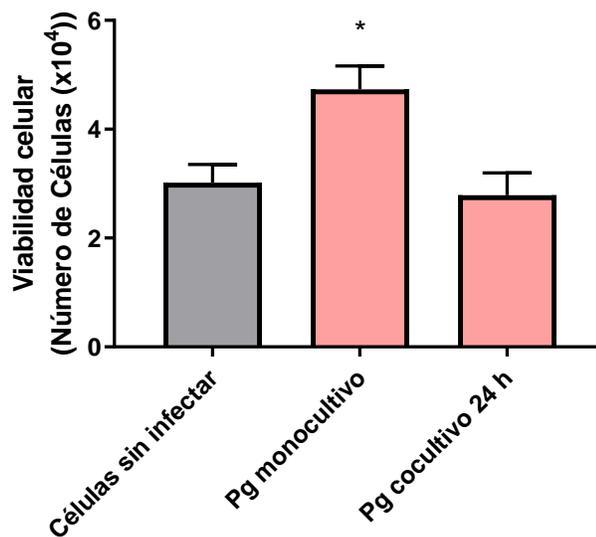


Figura 14. Cambios en el número de células epiteliales gingivales viables al infectar con *P. gingivalis* previamente co-cultivada o no con *H. pylori*. Número de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 viables, luego de ser infectadas con *P. gingivalis* control y *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 h, determinados mediante ensayos de Azul Tripán. Se observan los resultados luego de 24 h post-infección. One-way ANOVA, post-test Dunett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$

Adicionalmente, se realizaron ensayos de MTS y Azul Tripán con *P. gingivalis* previamente co-cultivada con las distintas mutantes en *H. pylori* descritas en el objetivo 1, con el fin de determinar si el co-cultivo con las mutantes podía provocar cambios luego de infectar células epiteliales. Los resultados indicaron que las mutantes no provocaban cambios en la sobrevivencia y proliferación de células infectadas al co-cultivarse con *P. gingivalis* (Figura 15)

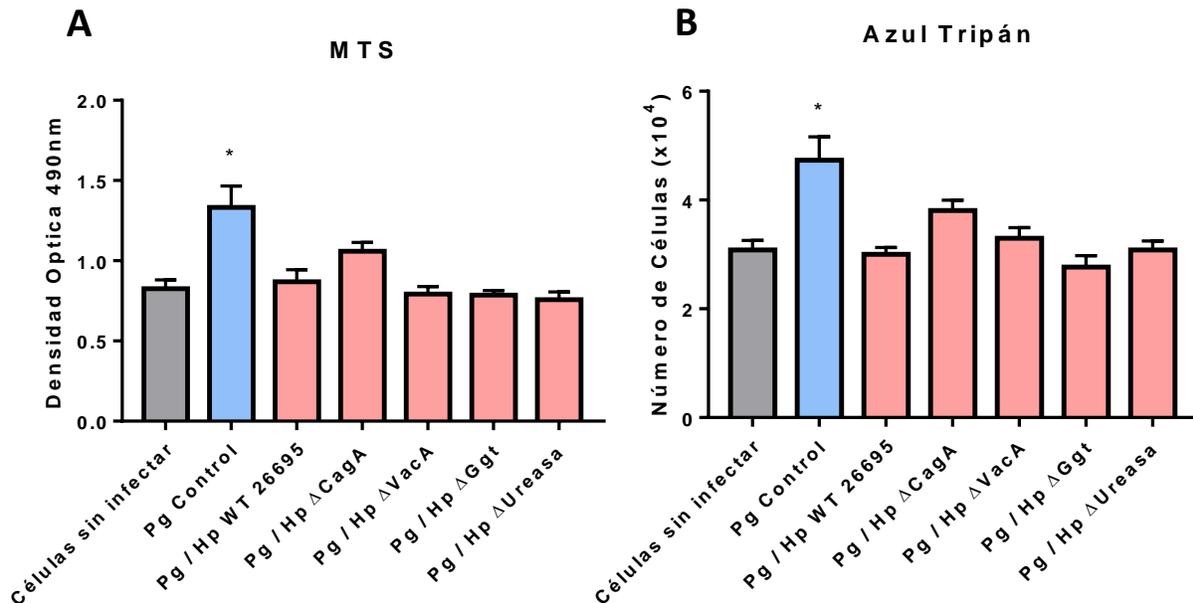


Figura 15. La infección con *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* silvestre y mutantes no provoca cambios en la sobrevivencia o el número de células epiteliales gingivales. (A) Densidad óptica a 490nm para determinar viabilidad mediante ensayos de MTS de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2, luego de ser infectadas con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 h. Se observan los resultados luego de 24 h post-infección. **(B)** Número de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 viables, luego de ser infectadas con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 h, determinados mediante ensayos de Azul Tripán. Se observan los resultados luego de 24 h post-infección. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$. $n=3$.

Finalmente, se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden. Para esto se infectaron células GECs con *P. gingivalis* (sin co-cultivar o previamente co-cultivada) a una multiplicidad de infección 100, durante 90 minutos. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 2 h en medio KSFM con una mezcla de antibióticos (gentamicina y metronidazol) para eliminar las bacterias extracelulares que no fueron capaces de ingresar a las células. Finalmente, se liberaron las células de la placa y se colocaron las células en el interior de la cámara de Boyden previamente tratadas con fibronectina. Bajo la cámara, se colocó medio KSFM suplementado con 10% suero fetal bovino como estímulo migratorio. Se dejó migrar durante 2 h para finalmente retirar la cámara y teñir las células que lograron migrar con cristal violeta. Se contabilizó las células que lograron migrar bajo microscopio óptico.

Los resultados mostraron que las células infectadas con *P. gingivalis* sin co-cultivar aumentaban la migración celular en 3,8 veces. Sin embargo, este efecto aumentó aún más en 8,2 veces al ser infectadas con *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* por 24 h (**Figura 16**).

Para vincular los resultados del aumento de la expresión de factores de virulencia en *P. gingivalis* en co-cultivo con los resultados de migración, y debido a que las gingipaínas pueden promover cambios en la migración celular de otras líneas celulares [28], se realizaron ensayos de migración en presencia de TLCK.

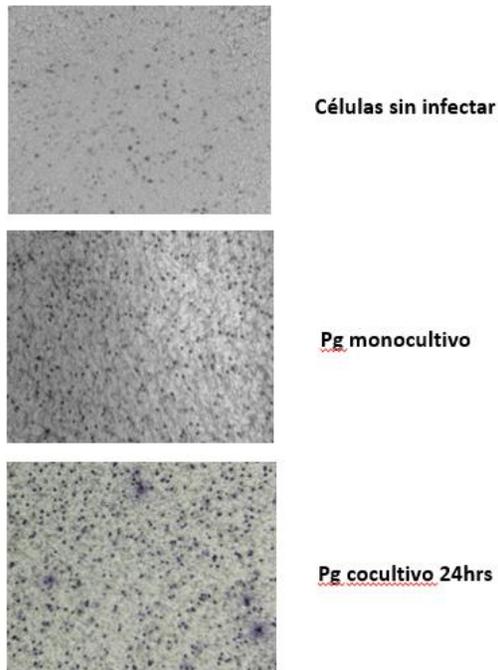
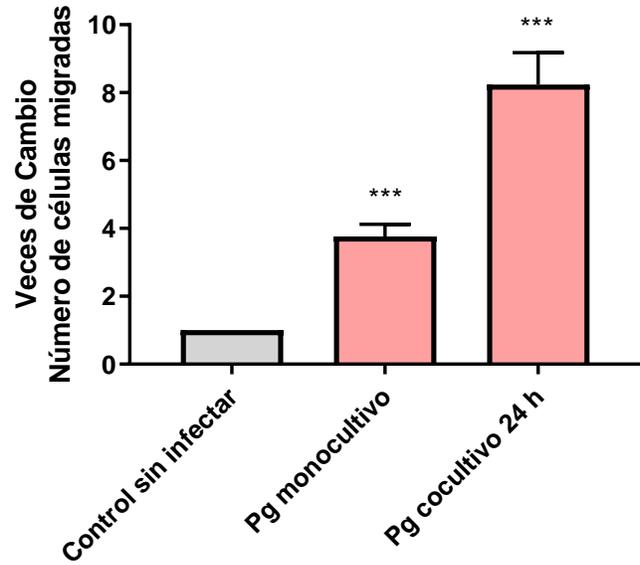
A**B**

Figura 16. *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori*, aumenta la migración de células epiteliales orales infectadas. (A) Imágenes de microscopia representativas de cámaras de Boyden teñidas con cristal violeta (B) Se muestran las veces de cambio en el número de células GEC migradas durante 2 h, luego de ser infectadas por 2 h con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* 24 h. Las veces de cambio corresponden al número de células migradas promedio luego del conteo de 7 campos. Se asignó arbitrariamente el valor de 1 (corresponde a aproximadamente 6-7 células) la migración de células sin infectar. One-way ANOVA, post-test Dunett. *** indica diferencias de $p < 0,001$. $n=3$

Para realizar el ensayo, se trató el cultivo bacteriano por 30 minutos a concentraciones de 50 y 100 μM del inhibidor previo a la infección. Las células fueron infectadas por 90 minutos junto al inhibidor y finalmente se protegieron por 2 h con gentamicina/metronidazol también en presencia del inhibidor. La migración se realizó por 2 h en ausencia del inhibidor.

Los resultados indican que la presencia del inhibidor TLCK de las gingipaínas, disminuye la migración en forma dosis dependiente tanto en células infectadas con *P. gingivalis* sin co-cultivar, como en su forma co-cultivada (**Figura 17**).

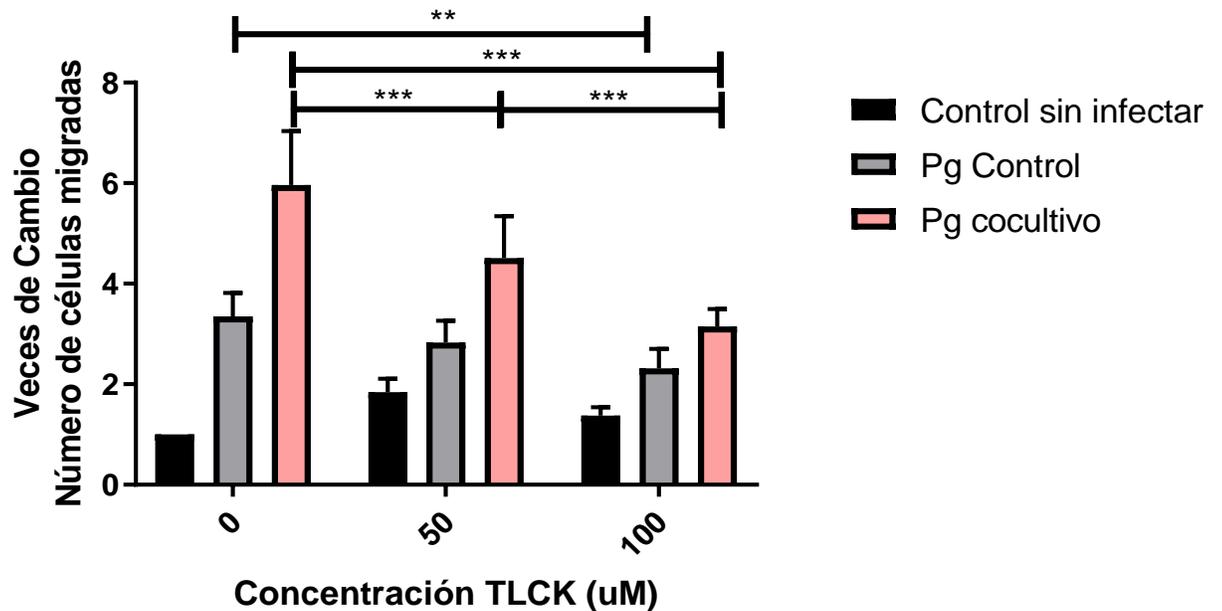


Figura 17. La incubación previa de *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* con el inhibidor de gingipaínas, disminuye su capacidad de promover la migración de células epiteliales orales infectadas. Se muestran las veces de cambio en la migración de 2 h de células OKF6/TERT2, luego de ser infectadas por 2 h con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* 24 h (ambas previamente incubadas con inhibidor de gingipaínas TLCK). Las veces de cambio corresponden al número de células migradas promedio luego del conteo de 7 campos. Se asignó arbitrariamente el valor de 1 (corresponde a aproximadamente 6-7 células) a la migración de células sin infectar en ausencia de TLCK. Two-way ANOVA, post-test Bonferroni. asigno arbitrariamente el valor de 1 a la migración de células sin infectar. ** indica diferencias significativas de $p < 0,01$ y *** de $p < 0,001$.

Interesantemente, estudios anteriores han reportado que la región del antígeno O del LPS de *P. gingivalis* sería clave en el procesamiento y activación final de las gingipaínas de arginina (como RgpB) [64, 65]. Como se observó un aumento en el mRNA de RgpB, se evaluó el rol del antígeno O en los cambios en migración. Para ello, utilizamos una cepa de *P. gingivalis* que carece de la región del antígeno O ($\Delta pg1051$). Los resultados entregaron que al realizar un co-cultivo de *P. gingivalis* $\Delta pg1051$ y *H. pylori* no se observa un aumento en la migración comparado con el co-cultivo con *P. gingivalis* silvestre o con *P. gingivalis* en monocultivo (**Figura 18**).

Adicionalmente, y para comprender el efecto de *H. pylori* sobre *P. gingivalis* y descartar un efecto de la primera bacteria sobre los cambios en migración observados, realizamos un ensayo de migración sobre células epiteliales gingivales infectadas con *H. pylori* y con *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* inactivada por calor. Los resultados mostraron que *H. pylori* no induce la migración de células epiteliales comparado con células sin infectar y que al infectar células con *gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* inactivada por calor no existen cambios en la migración comparado con el co-cultivo con *H. pylori* (**Figura 19**).

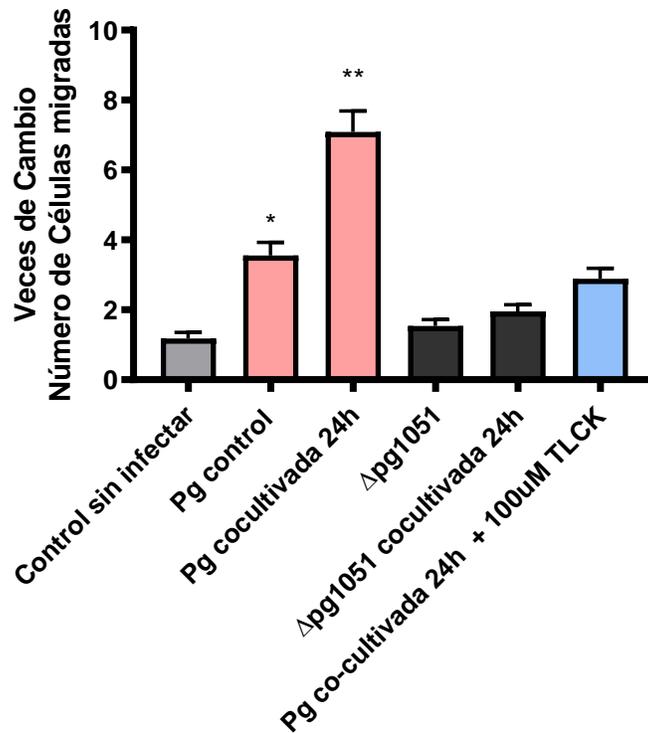


Figura 18. *P. gingivalis* Δpg1051 co-cultivada con *H. pylori*, no genera cambios en la migración de células epiteliales orales infectadas. Se muestran las veces de cambio en la migración de 2 h de células OKF6/TERT2, luego de ser infectadas por 2 h con *P. gingivalis* control y Δpg1051, *P. gingivalis* control y Δpg1051 co-cultivada con *H. pylori* 24 h. Las veces de cambio corresponden al número de células migradas promedio luego del conteo de 7 campos. Se asignó arbitrariamente el valor de 1 a la migración de células sin infectar- One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$ y ** de $p < 0,01$

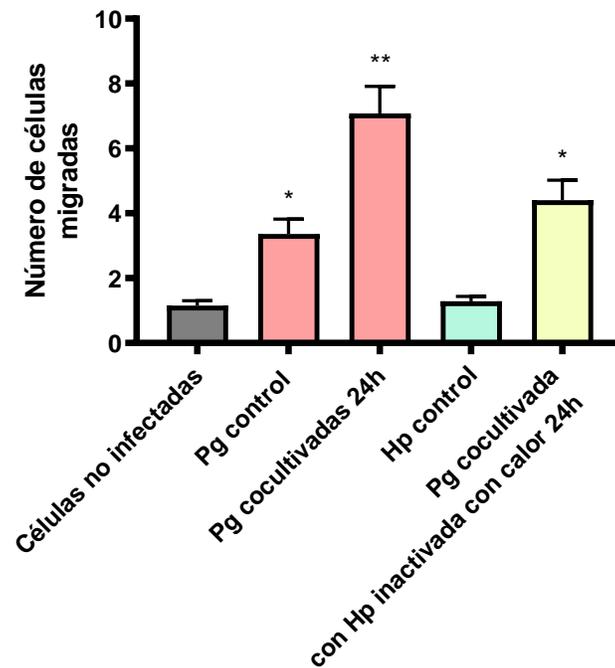


Figura 19: Migración de células epiteliales gingivales infectadas con *H. pylori* y *P. gingivalis* co-cultivadas con *H. pylori* inactivada por calor. Se muestran las veces de cambio en la migración de 2 h de células OKF6/TERT2, luego de ser infectadas por 2 h con *P. gingivalis* control, *H. pylori* control, *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* 24 h y con *H. pylori* inactivado con calor por 24 h. Las veces de cambio corresponden al número de células migradas promedio luego del conteo de 7 campos. Se asignó arbitrariamente el valor de 1 a la migración de células sin infectar- One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$ y ** de $p < 0,01$

Finalmente, se avaluó el rol de TLR4 en los cambios en migración, debido a que su activación promueve un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias [66, 67], y de esta forma poder vincular su activación con aumento en el mRNA y secreción de IL-8, y el aumento en el mRNA de TNF α y el consecuente el aumento en la migración.

Para ello, se transdujo las células OKF6/TERT2 con un plasmidio que contiene un *short hairpin RNA* (shRNA) contra TLR4 para promover un *knockdown* de la proteína y observar su efecto en la migración.

Se observó que la transducción con el shRNA contra TLR4 produjo una disminución de aproximadamente un 60% cuando se avaluó la proteína mediante western blot (**Figura 20A y B**). Cuando las células transducidas fueron infectadas con *P. gingivalis* co-cultivada o monocultivada, no se observó un incremento en la migración como si se había observado al infectar las células silvestres con *P. gingivalis* (**Figura 20 C**). Este resultado fue comprobado con otros shRNA contra TLR4 obteniendo los mismos resultados (**Figura 21**)

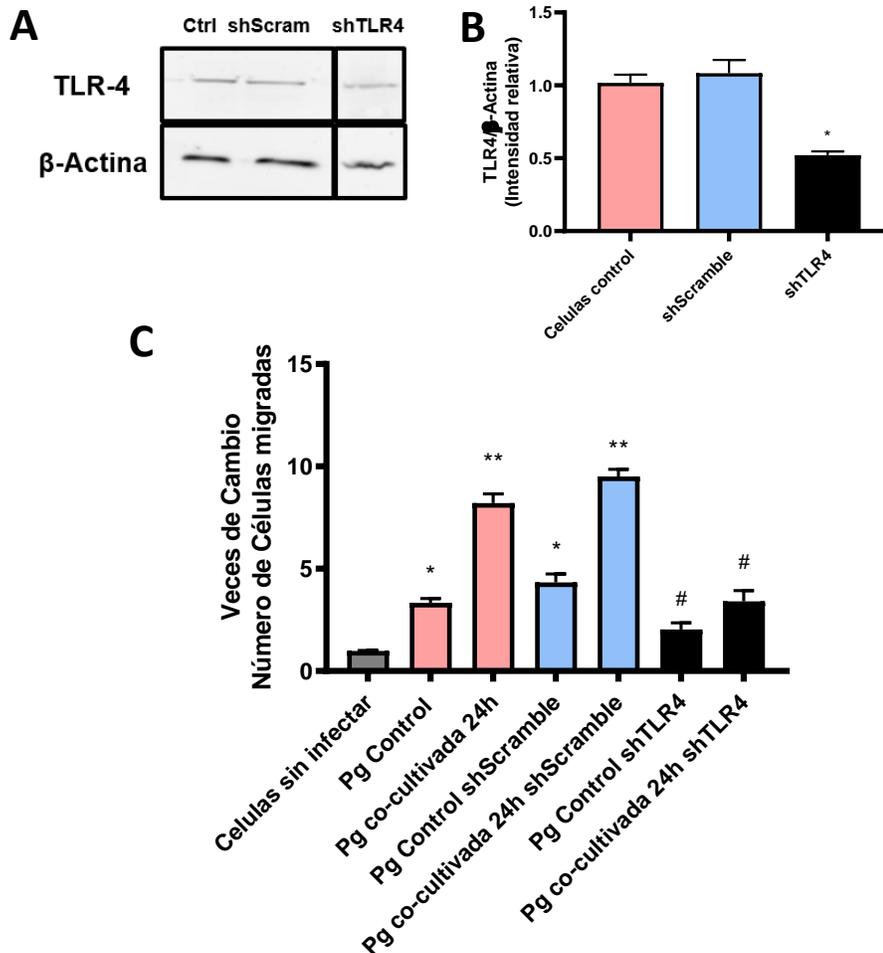


Figura 20. TLR4 participa en la migración de células epiteliales gingivales infectadas. (A) Blot representativo para los niveles de proteína TLR4 y β -actina en células OKF6/TERT2 control y células transfectadas con shRNA contra TLR4. (B) Cuantificación mediante densitometría de los datos obtenidos por Western blot para TLR4 y β -actina. (C) veces de cambio en el número de células GEC migradas durante 2 h, luego de ser infectadas por 2 h con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* 24 h. Las veces de cambio corresponden al número de células migradas promedio luego del conteo de 7 campos. Se asigno arbitrariamente el valor de 1 (corresponde a aproximadamente 6-7 células) a la migración de células sin infectar. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$, ** de $p < 0,001$ (contra células sin infectar) y # de $p < 0,05$ (contra *P. gingivalis* co-cultivado 24 h). $n = 4$

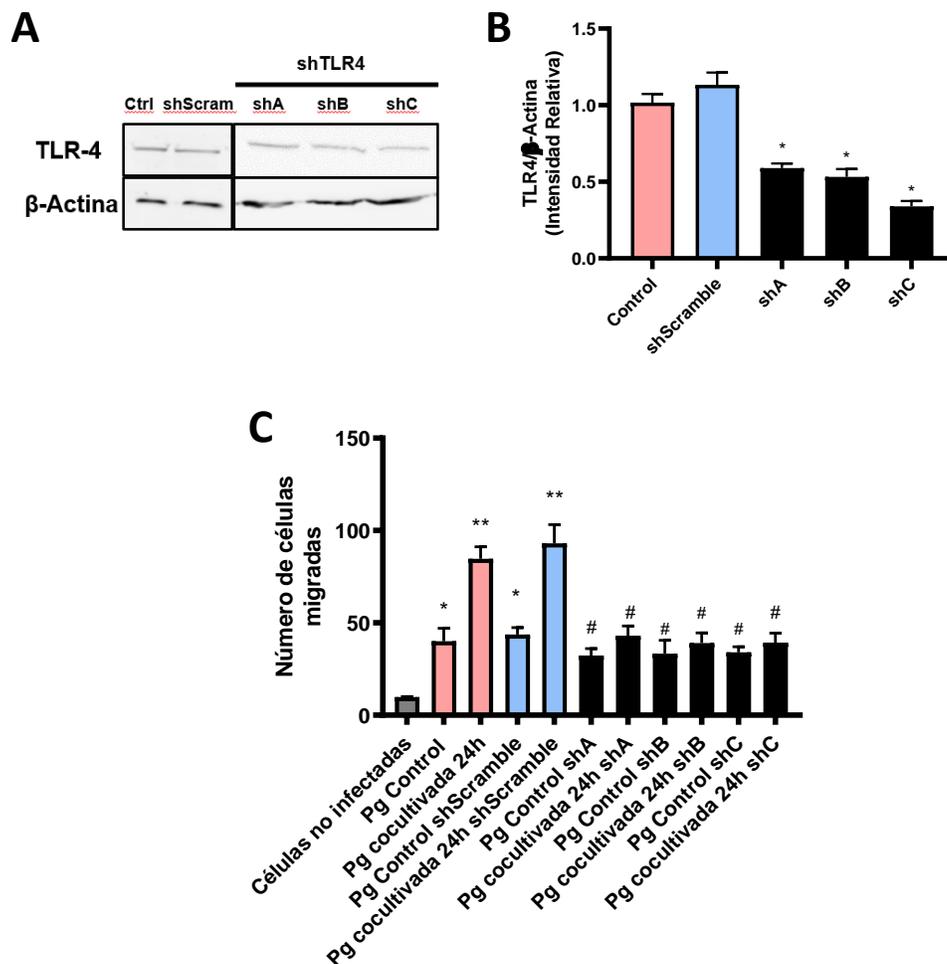


Figura 21. TLR4 participa en la migración de células epiteliales gingivales infectadas. (A) Blot representativo para los niveles de proteína TLR4 y β-actina en células OKF6/TERT2 control y células transfectadas con otros shRNA contra TLR4. (B) Cuantificación mediante densitometría de los datos obtenidos por Western blot para TLR4 y β-actina. (C) Veces de cambio en el número de células GEC migradas durante 2 h, luego de ser infectadas por 2 h con *P. gingivalis* control o *P. gingivalis* co-cultivada con *H. pylori* 24 h. Las veces de cambio corresponden al número de células migradas promedio luego del conteo de 7 campos. Se asignó arbitrariamente el valor de 1 (corresponde a aproximadamente 6-7 células) a la migración de células sin infectar. One-way ANOVA, post-test Dunnett. * indica diferencias significativas de $p < 0,05$, ** de $p < 0,001$ (contra células sin infectar) y # de $p < 0,05$ (contra *P. gingivalis* co-cultivado 24 h). $n = 4$

6. DISCUSIÓN

La biopelícula subgingival esta colonizada por una gran cantidad de especies bacterianas, volviéndolo una de las biopelículas más grandes conocidos dentro del cuerpo humano.

Estudios han determinado que más de 700 especies bacterianas conviven en esta biopelícula [68, 69], por lo tanto, es prudente preguntarse cuáles podrían ser las posibles interacciones en dicha biopelícula y cómo podrían influir en el desarrollo de las diferentes enfermedades periodontales, como la periodontitis, o también en otras enfermedades. *P. gingivalis* es un miembro de la biopelícula subgingival y una bacteria asociada al desarrollo de la periodontitis, la cual interactúa con diversas bacterias de la comunidad teniendo efectos que se pueden asociar a la patología. Meuric y colaboradores determinaron que la interacción entre *P. gingivalis* y otro miembro de la biopelícula subgingival, *T. denticola* es capaz de aumentar la capacidad adhesiva de *P. gingivalis*, permitiendo su anclaje con otras bacterias o con células que puede infectar [38]. Saito y colaboradores determinaron que la coinfección de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* aumenta la invasión de *P. gingivalis*, y en un modelo de periodontitis inducida en ratones, la coinfección promueve un aumento en la pérdida de hueso alveolar y el aumento de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β [70].

Sabiendo esto, es imposible no preguntarse cuál podría ser el rol de *H. pylori* en la biopelícula subgingival. Adler y colaboradores determinó que *H. pylori* reside

en la cavidad oral encontrándose en saliva, muestras supragingivales y en la biopelícula subgingival [71]. Andersen y colaboradores por su parte demostró que *H. pylori* no solo es parte de esta biopelícula, sino que además puede interactuar con miembros de ella, como *F. nucleatum* [46]. Junto a que bacterias no convencionales de la cavidad oral como *H. pylori* poseen una gran variedad de adhesinas y hemaglutininas [72-74], que su presencia en la cavidad oral está relacionada con un peor estado de salud periodontal [43] y que tratamientos en contra *H. pylori* en la cavidad oral están relacionados con un mejor pronóstico del tratamiento de la periodontitis [75, 76], creemos que este trabajo es un buen comienzo para entender las interacciones de *H. pylori* con otras bacterias de la cavidad oral y cuáles serían sus posibles efectos.

El objetivo de la primera parte de este trabajo de tesis fue estandarizar un co-cultivo entre *P. gingivalis* y *H. pylori* y determinar si dicho co-cultivo promovía cambios en la virulencia de *P. gingivalis*. Esto debido a que hasta la fecha no existen trabajos que vinculen a ambas bacterias dentro de la biopelícula subgingival o documenten si ambas interactúan de alguna forma en ella.

La estandarización del medio de cultivo para el co-cultivo, compuesto por BHI, hemina, menadiona, VITOX y suero equino, resultó positiva para el crecimiento de *P. gingivalis* y *H. pylori* hasta 48 horas. Esta aproximación no se aleja mucho de los mecanismos de estandarización utilizados en otras investigaciones, donde una mezcla de los medios de cultivo es suficiente para permitir el co-cultivo de

dos o más especies bacterianas [77, 78], sin embargo, se realizaron diversos controles que nos permiten descartar efectos del medio de cultivo sobre el crecimiento de ambas especies que expliquen los resultados obtenidos. Por ejemplo, los controles realizados nos permiten sugerir que la principal razón por la cual no se recupera *H. pylori* viable luego de las 48 horas es debido a la anaerobiosis estricta en la que se debe crecer el co-cultivo con el fin de recuperar *P. gingivalis* de él. Vale recordar que no hubo cambios en la tasa de proliferación de *P. gingivalis* entre el medio de co-cultivo y el medio de monocultivo, por lo cual podemos descartar que los resultados se deben a diferencias en la composición de los medios. Además, y gracias a los controles realizados donde probamos que *H. pylori* no crece en el mismo medio de *P. gingivalis* y que no crece en anaerobiosis, podemos descartar que *H. pylori* esté presente en el medio utilizado para infectar las células y también que los resultados obtenidos se deban a la presencia de *H. pylori*.

Posteriormente observamos que el co-cultivo de 24 h de *P. gingivalis* con *H. pylori*, promueve un aumento de la virulencia de *P. gingivalis*, expresada en un incremento en la capacidad de hemaglutinación, formación de biopelícula e invasión a células epiteliales gingivales. Para asociar estos resultados, realizamos qPCR para analizar un posible aumento de expresión en algunos genes de *P. gingivalis* asociados a su virulencia. Los resultados mostraron que existe un aumento en la expresión de factores de virulencia como hemaglutinina A y C, y gingipaína en arginina B de *P. gingivalis*. Bellanger y colaboradores y

Connolly y colaboradores determinaron que estas hemaglutininas son claves en la adhesión de la bacteria a superficies y a la interacción bacteria-bacteria, debido a que mutantes que carecen del gen para las hemaglutininas ven disminuida su capacidad de adhesión. Por tanto, el aumento en la expresión podría relacionarse con el aumento en la invasión bacteriana, la formación de biopelícula y la hemaglutinación vistos en los ensayos *in vitro*, debido a que factores como las hemaglutininas están fuertemente vinculados con la adherencia bacteriana e invasión intracelular de *P. gingivalis* [20, 21]. Además, se vió que el aumento de mRNA de RgpB se correlaciona con un aumento en la formación de producto debido al corte proteolítico de la enzima, lo que podría significar cambios en la señalización intracelular debido a los efectos que tienen estas enzimas en las células epiteliales, como degradación de proteínas apoptóticas [30], degradación de citoquinas [32, 33] y aumento de la migración [25, 28].

Para vincular los efectos del co-cultivo sobre la virulencia de la bacteria y sobre procesos celulares claves en el desarrollo de la periodontitis, como la migración de células para la formación de los sacos periodontales o la sobrevida de células en la mantención del nicho ecológico de *P. gingivalis* cuando infecta intracelularmente estas células, se realizaron ensayos de sobrevida, proliferación y migración. Los resultados obtenidos demuestran que se produce un aumento en la sobrevida y proliferación de las células del epitelio gingival al ser infectadas con *P. gingivalis* en monocultivo, tal cual como se había observado y reportado en un trabajo previo de nuestro laboratorio [35]. Sin embargo, no se vieron

cambios en sobrevida y proliferación de las células al ser infectadas con *P. gingivalis* co-cultivada al compararse con las células sin infectar. Este efecto podría explicarse con los estudios que determinan que *P. gingivalis* puede promover cambios contrarios dependiendo de la MOI con la que se trabaje [79], específicamente se ha visto que a menores MOI (25-50), *P. gingivalis* promueve la sobrevida celular, y MOI grandes (200-500) promueve la apoptosis celular. Debido a que existe un aumento en los factores de virulencia como HagA, HagC y RgpB, las células podrían sentir este aumento como si existiese una mayor concentración de *P. gingivalis* en el medio, equivalente a un aumento en la MOI, lo que podría explicar porque no se observó cambios al infectar con la bacteria co-cultivada.

A pesar de no ver cambios en proliferación y sobrevida, sí observamos un aumento en la migración de células infectadas con *P. gingivalis* monocultivada, y un mayor aumento con la bacteria co-cultivada. Este cambio en la migración podría deberse a los cambios en la virulencia de *P. gingivalis*, específicamente podrían estar participando las gingipaínas, debido a que se ha descrito que estas promoverían cambios en migración [25, 28]. Esta sugerencia se sustenta al usar el inhibidor de las gingipaínas TLCK, ya que su uso revirtió el aumento en la migración observada. En este mismo sentido, se ha descrito que el antígeno O del LPS de *P. gingivalis* cumple un rol clave en el procesamiento final de la proteasa e incluso promueve su activación [64, 65]. Al co-cultivar con una cepa mutante de *P. gingivalis* que carece del antígeno O, vimos que no aumentó la

migración como se observó con la cepa silvestre. Esto nos demuestra que las gingipaínas y su aumento debido al co-cultivo contribuyen al proceso de migración mediada por *P. gingivalis*. Estos resultados pueden ser respaldados por publicaciones que demuestran que el clivaje de receptores de membrana, como PAR2, por las gingipaínas promueven un aumento en la migración de microglías [80].

Por otro lado, los resultados obtenidos demuestran que el co-cultivo promueve un aumento en la expresión de mRNA de IL-8 y TNF α , y un aumento en la concentración extracelular de IL-8. Junto con el aumento en la formación de producto debido al corte proteolítico de la gingipaína RgpB la cual asociamos a una mayor cantidad de proteína, podríamos explicar el aumento en la migración, debido que tanto las citoquinas como dicha gingipaína están relacionadas con cambios en migración en células del epitelio gingival y otras líneas celulares [28, 81]. Sin embargo, es posible que el aumento en la expresión en las gingipaínas cumpla otro efecto relevante en este proceso, debido a que se ha visto que las gingipaínas tienen la capacidad de degradar citoquinas tanto a nivel extracelular como citoplasmático [30, 33, 61]. El efecto de un co-cultivo sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias ya había sido observado por Lee y Baek, donde demostraron que al co-cultivar *P. gingivalis* con *F. nucleatum*, el LPS de *P. gingivalis* purificado desde el co-cultivo promovía un aumento de la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IL-8 en monocitos THP-1 [82].

Nuestros resultados de multiplex nos muestran que al inhibir las gingipaínas con TLCK aumentó la concentración de IL-8 secretada comparada con las células sin tratamiento de TLCK. Esto podría indicar que el aumento en la expresión de las gingipaínas podría degradar las citoquinas secretadas. A su vez, esto explicaría la posible diferencia observada entre el mRNA de TNF α y la secreción de esta proteína, dado que no observamos cambios en la expresión proteica de esta citoquina, pero si un aumento de su mRNA. Adicionalmente, nuestro ensayo de multiplex permitió la medición de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1 β , sin embargo, los resultados entregados son iguales a los observados en TNF- α .

Vale la pena destacar que los resultados de Multiplex obtenidos para TNF α difieren de los resultados obtenidos en el qPCR contra el gen de TNF α , por lo cual podría existir una razón externa de porque no estamos observando un aumento en la expresión proteica de esta citoquina (y tal vez también de IL-6 e IL-1 β). Debido a que solo observamos la secreción de las citoquinas, puede ocurrir de que las citoquinas se encuentren en mayor concentración al interior de las células, por lo cual un cambio en el protocolo de obtención de muestras para el ensayo de Multiplex nos ayudaría a develar esta incógnita.

Finalmente, y para asociar los cambios en la expresión de citoquinas y el consiguiente aumento en la migración de las células epiteliales orales al ser infectadas con *P. gingivalis*, se analizó el posible papel del receptor TLR4 en la

migración. Es sabido que el receptor TLR4 y su activación por diferentes factores de virulencia bacterianos como la fimbria y el LPS, pueden promover la activación de NF- κ B y la secreción de interleuquinas como IL-8 y TNF α , y la activación de procesos migratorios en células gliales y del epitelio oral [54-56, 59, 60]. Para ver si este receptor tendría una participación en procesos migratorios mediante la activación de quinasas como ERK1/2, Akt y el factor de transcripción NF- κ B se transdujeron las células OKF6/TERT2 con un shRNA contra TLR4, logrando disminuir la expresión de TLR4 en un 60%. Debido a esto, logramos observar que el *knock down* de TLR4 impidió que la infección con *P. gingivalis* promoviera el aumento en la migración observado al infectar células sin transducir. Este efecto podría deberse directamente a la activación de NF- κ B y un aumento en la expresión de IL-8 y TNF α . Sin embargo, también se ha observado que la activación de TLR4 puede activar a ERK1/2 y a Akt1, las cuales están asociadas a la activación de procesos relacionados con invasión y migración celular [59, 60, 83-85]. Debido a esto, comprender y estudiar las vías de señalización activadas por el receptor aportarían un valioso conocimiento a este proceso y contribuiría a entender cómo se estaría activando la migración de estas células y como asociar estos cambios a procesos biológicos importantes en la cavidad oral. **Por ejemplo, Se ha visto que bacterias orales como *F. nucleatum* pueden activar no solo tipo toll como TLR2 y TLR4, si no también receptores para productos terminales de glicosilación avanzada (RAGE) y permitir la activación de vías de señalización como MAPK, PI3K/Akt, NF- κ B y JAK/STAT. Estas vías están asociadas a**

procesos relacionados con el cáncer, como sobrevida y la transición epitelio-mesénquima (EMT) [86, 87].

Hasta ahora, aún se desconoce la forma en que *H. pylori* podría promover estos cambios en *P. gingivalis*. Sin embargo, ya hemos descartado la participación de algunos factores de virulencia en *H. pylori* importantes en la virulencia de la bacteria y la sobrevida de ella en la cavidad gástrica, como CagA, VacA, Ureasa y GGT, debido a que co-cultivos de *P. gingivalis* con mutantes en estos factores de virulencia siguieron promoviendo los mismos cambios vistos al co-cultivarse con la cepa silvestre 26695. También determinamos que *H. pylori* inactivada por calor no genera los cambios observados sobre *P. gingivalis* comparado con *H. pylori* normal. Esta última observación nos permite comprender un poco más los posibles mecanismos utilizados por la bacteria, debido a que la inactivación por calor húmeda genera muerte de la bacteria debido a daño en la membrana bacteriana según lo descrito por Rabiei y colaboradores [88]. Este posible daño en la membrana puede generar cambios en las proteínas usadas por la bacteria para la adherencia y imposibilitar la interacción de esta con *P. gingivalis*.

En resumen, en este estudio desarrollamos un sistema de co-cultivo para demostrar que la incubación de *H. pylori* con *P. gingivalis* aumenta la virulencia de *P. gingivalis* debido a la expresión de ciertos genes de virulencia. Estos cambios promueven no solo un aumento en la expresión de IL-8 y TNF α y la secreción de IL-8, sino también un aumento de la migración de células epiteliales

gingivales OKF6/TERT2 infectadas, y que nuestras observaciones atribuyen este efecto al aumento en la expresión de la gingipaína de *P. gingivalis* RgpB y la activación de TLR4 (**Figura 22**). Estos resultados entregan por primera vez información sobre las consecuencias al nivel molecular de la interacción entre *P. gingivalis* y *H. pylori*. Finalmente, también se entrega los primeros conocimientos sobre el mecanismo por el cual *H. pylori* podría estar aumentando la severidad o progresión de la periodontitis tras la colonización de la cavidad oral. Dada la prevalencia de *H. pylori* en todo el mundo, y de la prevalencia de las enfermedades periodontales, sobre todo en nuestro país, este es un aspecto que merece ser considerado a la hora de contemplar nuevas políticas de salud pública, especialmente en el área odontológica y de microbiología oral.

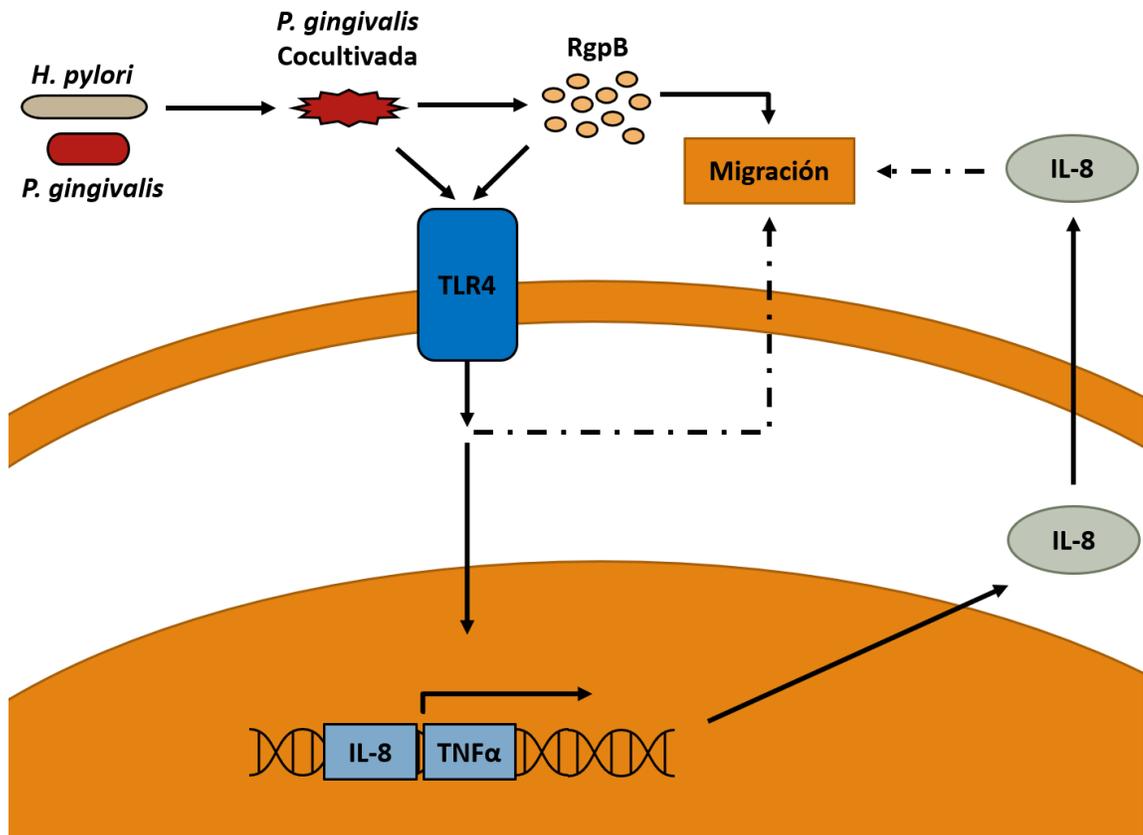


Figura 22: Modelo propuesto para el efecto del co-cultivo de *H. pylori* y *P. gingivalis* sobre la secreción de IL-8 y la migración de células epiteliales gingivales. El co-cultivo de *H. pylori* con *P. gingivalis* permite cambios en la expresión de factores de virulencia en *P. gingivalis* que permiten un aumento en la expresión y secreción de IL-8 y en la migración de células epiteliales gingivales. Este efecto puede ocurrir debido a la expresión de gingipaína RgpB, a la activación de TLR4 o al aumento en la secreción de IL-8.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró generar un medio de co-cultivo para *P. gingivalis* y *H. pylori* compuesto por BHI, hemina 1%, menadiona 1%, VITOX 2% y suero equino 5%, a 37°C en anaerobiosis y agitación orbital, permite el crecimiento de ambas bacterias por 48 h. Este medio de co-cultivo permitió que *H. pylori* promueva un aumento en la hemaglutinación, la invasión intracelular y la formación de biopelícula de *P. gingivalis*, junto un aumento en el mRNA de los genes *hagA*, *hagC* (hemaglutininas) y *rgpB* (gingipaína de arginina) de *P. gingivalis*.

Al utilizar *P. gingivalis* para infectar células epiteliales gingivales OKF6/TERT2, se logró observar que el co-cultivo de *P. gingivalis* con *H. pylori* promueve un aumento en el mRNA de IL-8 y TNF α , y la secreción de IL-8. Además, el co-cultivo de ambas bacteria promovió un aumento en la migración de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 infectadas con *P. gingivalis*, en donde el aumento en la expresión de las gingipaínas fue clave.

Finalmente, se logró observar que *P. gingivalis* co-cultivada con *H.pylori* promovió un aumento en la migración de células epiteliales gingivales OKF6/TERT2 infectadas con *P. gingivalis* mediante el receptor TLR4.

8. REFERENCIAS

1. Choi JI, Seymour GJ. Vaccines against periodontitis: a forward-looking review. *J Periodontal Implant Sci* **2010**; 40:153-63.
2. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000* **2012**; 60:15-39.
3. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* **2014**; 93:1045-53.
4. Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, et al. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol* **2010**; 81:1403-10.
5. Clark WB, Loe H. Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000* **1993**; 2:72-82.
6. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **1994**; 5:78-111.
7. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* **2012**; 27:409-19.
8. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med* **2015**; 21:172-83.
9. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14:727-52, table of contents.
10. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* **2009**; 24:469-77.
11. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**; 62:1244-63.
12. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **1998**; 25:134-44.
13. Gajardo M, Silva N, Gomez L, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* **2005**; 76:289-94.

14. Diaz L, Hoare A, Soto C, et al. Changes in lipopolysaccharide profile of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolates correlate with changes in colony morphology and polymyxin B resistance. *Anaerobe* **2015**; 33:25-32.
15. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res* **2006**; 85:392-403.
16. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000* **2005**; 38:72-122.
17. Inaba H, Kawai S, Kato T, Nakagawa I, Amano A. Association between epithelial cell death and invasion by microspheres conjugated to *Porphyromonas gingivalis* vesicles with different types of fimbriae. *Infect Immun* **2006**; 74:734-9.
18. Papapanou PN, Sandros J, Lindberg K, Duncan MJ, Niederman R, Nannmark U. *Porphyromonas gingivalis* may multiply and advance within stratified human junctional epithelium in vitro. *J Periodontal Res* **1994**; 29:374-5.
19. Sandros J, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodontal Res* **1994**; 29:62-9.
20. Belanger M, Kozarov E, Song H, Whitlock J, Progulske-Fox A. Both the unique and repeat regions of the *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin A are involved in adhesion and invasion of host cells. *Anaerobe* **2012**; 18:128-34.
21. Connolly E, Millhouse E, Doyle R, Culshaw S, Ramage G, Moran GP. The *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinins HagB and HagC are major mediators of adhesion and biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* **2017**; 32:35-47.
22. Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* **1997**; 65:313-6.
23. Amano A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci* **2007**; 12:3965-74.
24. Eskin MA, Hajishengallis G, Kinane DF. Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun* **2007**; 75:892-8.
25. Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol Immunol* **2009**; 24:11-7.
26. Fujita T, Yoshimoto T, Matsuda S, et al. Interleukin-8 induces DNA synthesis, migration and down-regulation of cleaved caspase-3 in cultured human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* **2015**; 50:479-85.

27. Lee JS, Lee JB, Cha JK, et al. Chemokine in inflamed periodontal tissues activates healthy periodontal-ligament stem cell migration. *J Clin Periodontol* **2017**; 44:530-9.
28. Laheij AM, van Loveren C, Deng D, de Soet JJ. The impact of virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* on wound healing in vitro. *J Oral Microbiol* **2015**; 7:27543.
29. Hintermann E, Haake SK, Christen U, Sharabi A, Quaranta V. Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in *Porphyromonas gingivalis*-infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling. *Infect Immun* **2002**; 70:5846-56.
30. Abdi K, Chen T, Klein BA, et al. Mechanisms by which *Porphyromonas gingivalis* evades innate immunity. *PLoS One* **2017**; 12:e0182164.
31. Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **2004**; 72:3743-51.
32. Zhang F, Qiu Q, Song X, Chen Y, Wu J, Liang M. Signal-Regulated Protein Kinases/Protein Kinase B-p53-BH3-Interacting Domain Death Agonist Pathway Regulates Gingipain-Induced Apoptosis in Osteoblasts. *J Periodontol* **2017**; 88:e200-e10.
33. Jung YJ, Jun HK, Choi BK. Contradictory roles of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in caspase-1 activation. *Cellular microbiology* **2015**; 17:1304-19.
34. Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol 2000* **2010**; 54:53-70.
35. Soto C, Bugueno I, Hoare A, et al. The *Porphyromonas gingivalis* O antigen is required for inhibition of apoptosis in gingival epithelial cells following bacterial infection. *J Periodontal Res* **2016**; 51:518-28.
36. Song B, Zhou T, Yang WL, Liu J, Shao LQ. Programmed cell death in periodontitis: recent advances and future perspectives. *Oral Dis* **2017**; 23:609-19.
37. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* **2003**; 11:94-100.
38. Meuric V, Martin B, Guyodo H, et al. *Treponema denticola* improves adhesive capacities of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol* **2013**; 28:40-53.
39. Tan KH, Seers CA, Dashper SG, et al. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* exhibit metabolic symbioses. *PLoS Pathog* **2014**; 10:e1003955.

40. Ito R, Ishihara K, Shoji M, Nakayama K, Okuda K. Hemagglutinin/Adhesin domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2010**; 60:251-60.
41. Crow D. Know the jargon. *Sci Am* **2014**; 311:24.
42. Chen SY, Zhang RG, Duan GC. Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review). *Oncol Rep* **2016**; 36:3087-94.
43. Hu Z, Zhang Y, Li Z, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on chronic periodontitis by the change of microecology and inflammation. *Oncotarget* **2016**; 7:66700-12.
44. Anand PS, Nandakumar K, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with *Helicobacter pylori* infection? *J Periodontol* **2006**; 77:692-8.
45. Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Guzik TJ, Loster B, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. *J Physiol Pharmacol* **2005**; 56 Suppl 6:77-89.
46. Andersen RN, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE. *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium spp.* *Oral Microbiol Immunol* **1998**; 13:51-4.
47. Carlsohn E, Nystrom J, Bolin I, Nilsson CL, Svennerholm AM. HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. *Infect Immun* **2006**; 74:920-6.
48. O'Toole PW, Janzon L, Doig P, Huang J, Kostrzynska M, Trust TJ. The putative neuraminylactose-binding hemagglutinin HpaA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *J Bacteriol* **1995**; 177:6049-57.
49. Petersson C, Forsberg M, Aspholm M, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin evokes a strong inflammatory response in human neutrophils which is down-regulated by the neutrophil-activating protein. *Med Microbiol Immunol* **2006**; 195:195-206.
50. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin (IL)-1beta, IL-6, and IL-8 Impair In Vitro Migration and Induce Apoptosis of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells, Delaying Wound Healing. *J Periodontol* **2016**; 87:990-6.
51. Hajishengallis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E. Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunol Invest* **2004**; 33:157-72.

52. Li J, Lee DS, Madrenas J. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol* **2013**; 4:347.
53. Li S, Song Z, Dong J, Shu R. microRNA-142 is upregulated by tumor necrosis factor-alpha and triggers apoptosis in human gingival epithelial cells by repressing BACH2 expression. *Am J Transl Res* **2017**; 9:175-83.
54. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* **2005**; 7:122-33.
55. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Hausser A, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **2004**; 279:677-85.
56. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **2003**; 10:45-65.
57. Diomedea F, Zingariello M, Cavalcanti M, et al. MyD88/ERK/NFkB pathways and pro-inflammatory cytokines release in periodontal ligament stem cells stimulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Histochem* **2017**; 61:2791.
58. Groeger S, Jarzina F, Domann E, Meyle J. *Porphyromonas gingivalis* activates NFkappaB and MAPK pathways in human oral epithelial cells. *BMC Immunol* **2017**; 18:1.
59. Fujita Y, Nakayama M, Naito M, et al. Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signal transduction pathways. *Infect Immun* **2014**; 82:202-11.
60. Imamura K, Kokubu E, Kita D, et al. Role of mitogen-activated protein kinase pathways in migration of gingival epithelial cells in response to stimulation by cigarette smoke condensate and infection by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* **2016**; 51:613-21.
61. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microbial pathogenesis* **1999**; 26:275-80.
62. Saini S, Liu T, Yoo J. TNF-alpha stimulates colonic myofibroblast migration via COX-2 and Hsp27. *J Surg Res* **2016**; 204:145-52.
63. Wolczyk D, Zaremba-Czogalla M, Hryniewicz-Jankowska A, et al. TNF-alpha promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cell Oncol (Dordr)* **2016**; 39:353-63.

64. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, et al. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol Res **1999**; 34:464-72.
65. Curtis MA, Thickett A, Slaney JM, et al. Variable carbohydrate modifications to the catalytic chains of the RgpA and RgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect Immun **1999**; 67:3816-23.
66. An H, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. Immunology **2002**; 106:38-45.
67. Nassar H, Chou HH, Khlgatian M, Gibson FC, 3rd, Van Dyke TE, Genco CA. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. Infect Immun **2002**; 70:268-76.
68. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. Journal of clinical microbiology **2005**; 43:5721-32.
69. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. The ISME journal **2013**; 7:1016-25.
70. Saito A, Kokubu E, Inagaki S, et al. *Porphyromonas gingivalis* entry into gingival epithelial cells modulated by *Fusobacterium nucleatum* is dependent on lipid rafts. Microbial pathogenesis **2012**; 53:234-42.
71. Adler I, Muino A, Aguas S, et al. *Helicobacter pylori* and oral pathology: relationship with the gastric infection. World journal of gastroenterology **2014**; 20:9922-35.
72. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, et al. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. J Biol Chem **2005**; 280:15390-7.
73. Valkonen KH, Wadstrom T, Moran AP. Identification of the N-acetylneuraminyllactose-specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*. Infect Immun **1997**; 65:916-23.
74. Walz A, Odenbreit S, Mahdavi J, Boren T, Ruhl S. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. Glycobiology **2005**; 15:700-8.
75. Gebara EC, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. J Clin Periodontol **2006**; 33:329-33.

76. Tongtawee T, Wattanawongdon W, Simawaranon T. Effects of periodontal therapy on eradication and recurrence of *Helicobacter pylori* infection after successful treatment. *J Int Med Res* **2019**; 47:875-83.
77. Fouladkhah A, Geornaras I, Sofos JN. Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella typhimurium* and newport and their inactivation by sanitizers. *J Food Sci* **2013**; 78:M880-6.
78. Hu H, Catchmark JM, Demirci A. Effects of pullulan additive and co-culture of *Aureobasidium pullulans* on bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii*. *Bioprocess Biosyst Eng* **2022**; 45:573-87.
79. Pan C, Xu X, Tan L, Lin L, Pan Y. The effects of *Porphyromonas gingivalis* on the cell cycle progression of human gingival epithelial cells. *Oral Dis* **2014**; 20:100-8.
80. Nonaka S, Nakanishi H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2. *Neurochemistry international* **2020**; 140:104840.
81. Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, et al. Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. *Scientific reports* **2017**; 7:11759.
82. Lee SH, Baek DH. Characteristics of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in co-culture with *Fusobacterium nucleatum*. *Mol Oral Microbiol* **2013**; 28:230-8.
83. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* **2009**; 21:470-6.
84. Harsha C, Banik K, Ang HL, et al. Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *International journal of molecular sciences* **2020**; 21.
85. He J, Ye W, Kou N, et al. MicroRNA-29b-3p suppresses oral squamous cell carcinoma cell migration and invasion via IL32/AKT signalling pathway. *J Cell Mol Med* **2020**; 24:841-9.
86. Palumbo R, De Marchis F, Pusterla T, Conti A, Alessio M, Bianchi ME. Src family kinases are necessary for cell migration induced by extracellular HMGB1. *J Leukoc Biol* **2009**; 86:617-23.
87. Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, et al. p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev* **2002**; 16:984-93.

88. Rabiei P, Mohabatkar H, Behbahani M. Studying the effects of several heat-inactivated bacteria on colon and breast cancer cells. *Mol Biol Res Commun* **2019**; 8:91-8.