



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE INMUNOLOGÍA

EFFECTO DE LA INFECCIÓN *Porphyromonas gingivalis* EN LOS OSTEÓBLASTOS HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

P R E S E N T A:

C. D. LUIS ALBERTO CASTILLO DÍAZ

DIRECTORAS DE TESIS

DRA. BLANCA ESTELA GARCÍA PÉREZ
DRA. JULIETA LUNA HERRERA



México, D. F. 2010

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela García Perez y la Dra. Julieta Luna Herrera.

El presente trabajo recibió apoyo financiero de la SIP-IPN a través de los proyectos 20101251 y 2101234 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto: CONACyT SEP-2004-CO1-47496.

El autor de este proyecto agradece encarecidamente el apoyo económico recibido a través del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN) y del CONACyT a través de la beca: 219599

AGRADECIMIENTOS

Dra. Blanca Estela García Pérez

Dra. Julieta Luna Herrera

Dra. Graciela Castro Escarpulli y Dra. Guadalupe Aguilera Arreola

Dra. Isabel Salazar Sánchez

Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont

M. en C. Ana Lilia García Hernández

M. en C. Elsa Calleja Quevedo y Biól. Ana Federica Chávez Sánchez

Dr. Rubén López Santiago

Dra. Iris Estrada García

Dra. Jeanet Serafín López

Q. B. P. Guillermo Ortiz Martínez y Q. B. P. Ilse Angélica Pérez Pérez

M. en C. Ana Rosa Muñoz Duarte

M. en C. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

M. en C. Virginia González Reyes

Dr. Juan Carlos Hernández González

Q. B. P. Ricardo Ruíz Nicolás

M. en C. Orestes López Ortega

M. en C. Marcela Torres Hernández

M. en C. Sonia López García

Dra. María Esther Sánchez Espíndola

M. en C. María Guadalupe Sandoval González

Ya que sin su apoyo, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi esposa: Elizabeth Reyes Martínez

*A mis padres: Hortensia Díaz Rosales
José Luis Castillo Toríz*

*A mis Hermanas: Janet Castillo Díaz
Brenda Angélica Castillo Díaz*

A la Dra. Elsa Aurora Calleja Quevedo

A mis amigos

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
Índice de figuras.	I
Índice de tablas.	II
Abreviaturas.	III
Resumen.	V
Abstract.	VI
Introducción.	1
Microbiota de la cavidad oral.	1
El fluido crevicular gingival (GFC).	1
La saliva.	2
La enfermedad periodontal (periodontitis).	3
Susceptibilidad a la enfermedad periodontal.	5
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P. gingivalis</i>).	6
El polisacárido capsular.	8
Las fimbrias.	9
Las hemaglutininas.	10
Las proteasas (gingipaínas).	10
Dipeptidil aminopeptidasa IV (DPPIV).	11
El lipopolisacárido (LPS).	12
Evasión de la respuesta inmune.	14
Interacción de <i>Porphyromonas gingivalis</i> con las células epiteliales.	15
Interacción de <i>Porphyromonas gingivalis</i> con las células endoteliales.	21
Interacción de <i>Porphyromonas gingivalis</i> con los fibroblastos.	27
Interacción de <i>Porphyromonas gingivalis</i> con los osteoblastos.	30
Justificación.	34
Hipótesis.	34

	PÁGINA
Objetivos.	34
General.	34
Particulares.	34
Material y métodos.	35
Material biológico.	35
Línea celular.	
Bacteria.	35
Preparación de las monocapas.	36
Determinación de unidades formadoras de colonas de <i>P. gingivalis</i> en los osteoblastos humanos.	36
Efecto de los inhibidores endocíticos en la interiorización de <i>P. gingivalis</i> a los osteoblastos humanos.	36
Microscopía óptica de la interacción de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	38
Participación del citoesqueleto en la entrada de <i>P. gingivalis</i> a los osteoblastos humanos.	38
Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la interiorización de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	40
Resultados.	41
Evaluación macroscópica y microscópica de la cepa bacteriana.	41
Sobrevida de <i>P. gingivalis</i> en los osteoblastos humanos.	41
Efecto de los inhibidores endocíticos sobre la viabilidad de los osteoblastos humanos.	42
Efecto de los inhibidores endocíticos en la interiorización de <i>P. gingivalis</i> a los osteoblastos humanos.	44
Interacción de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	52
Determinación ultraestructural de la interiorización de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	54
Participación de los microtúbulos en la interiorización de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	55
Participación de los filamentos de actina en la interiorización de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	57
Discusión.	60
Conclusiones.	66
Bibliografía.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		PÁGINA
1	Activación de diferentes vías de señalización en las células epiteliales por factores de virulencia de <i>P. gingivalis</i> .	21
2	Interiorización de <i>P. gingivalis</i> por las células endoteliales, vía autofagosómica.	25
3	Morfología microscópica y macroscópica de <i>P. gingivalis</i> .	41
4	Cinéticas de infección de <i>P. gingivalis</i> en osteoblastos humanos.	42
5	Efecto de los inhibidores endocíticos sobre la viabilidad de los osteoblastos.	43
6	Porcentaje de viabilidad de los osteoblastos humanos después de la adición de los inhibidores endocíticos.	44
7	Efecto inhibitor de la citocalasina D sobre la interiorización de <i>P. gingivalis</i> por los osteoblastos humanos .	45
8	Efecto inhibitor del nocodazol sobre la interiorización de <i>P. gingivalis</i> por los osteoblastos humanos.	46
9	Efecto inhibitor de la colchicina sobre la interiorización de <i>P. gingivalis</i> por los osteoblastos humanos.	47
10	Efecto inhibitor de la wortmanina sobre la interiorización de <i>P. gingivalis</i> por los osteoblastos humanos.	48
11	Efecto inhibitor del LY 294002 sobre la interiorización de <i>P. gingivalis</i> por los osteoblastos humanos.	49
12	Efecto inhibitor del amilórido sobre la interiorización de <i>P. gingivalis</i> por los osteoblastos humanos.	50
13	Interacción de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	53
14	Micrografías electrónicas de la interacción de <i>P. gingivalis</i> con los osteoblastos humanos.	55
15	Imágenes de la interacción de <i>P. gingivalis</i> con los microtúbulos de los osteoblastos.	57
16	Imágenes de la interacción de <i>P. gingivalis</i> con los filamentos de actina de los osteoblastos humanos.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		PÁGINA
1	Concentraciones de inhibidores endocíticos.	37
2	Porcentaje de inhibición de los diferentes inhibidores endocíticos.	51

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
CASMC	Células endoteliales del músculo liso de arterias coronarias
DAPI	4', 6-diamidino-2 fenilindol
DPPIV	Dipeptidil aminopeptidasa IV
EC	Células endoteliales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Cinasas reguladoras de señal extracelular
FAK	Cinasas de adhesión focal
FBHEC	Células endoteliales de corazón bovino fetal
Fim A	Fimbria principal
FITC	Isotiocianato de fluorescenina
GCF	Fluido crevicular gingival
GEC	Células epiteliales gingivales
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HCAEC	Células endoteliales de arteria coronaria humana
HGF	Fibroblastos gingivales humanos
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
Ig	Inmunoglobulina
IFN-γ	Interferón gamma
IHGE	Células epiteliales gingivales humanas inmortalizadas
IL	Interleucina
kgp	Lis-gingipaínas
LBP	Proteína unidora de LPS
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógeno
MCP-1	Proteína-1 quimiotáctica de monocitos
M-CSF	Factor estimulador de la colonia de los macrófagos
MEM-α	Medio mínimo esencial modificación- α
MMP	Metaloproteinasas de matriz

MOI	Multiplicidad de infección
MVs	Vesículas de membrana externa
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NKD	Nucleósido difosfato cinasa
NO	Óxido nítrico
NOD	Proteína con dominio de oligomerización unido a nucleótido
OPG	Osteoprotegerina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PARs	Receptores activados por proteasas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PGs	Prostaglandinas
PI 3-K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
PTH	Hormona paratiroidea
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
rgpA	Arg-gingipaínas A
rgpB	Arg-gingipaínas B
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopy electron scanning
SFB	Suero Fetal Bovino
SMC	Células del músculo liso
SOD	Superóxido dismutasa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UFCs	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN.

La enfermedad periodontal (periodontitis) se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico y destrucción del tejido periodontal, en casos severos induce movimiento y pérdida de los dientes. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es una bacteria Gram-negativa anaerobia estricta, considerada como el principal agente en el desarrollo etiológico y progresión de la enfermedad periodontal. Actualmente se sabe que *P. gingivalis* es capaz de infectar y ser interiorizada a las células epiteliales, células endoteliales y los fibroblastos, esta interacción induce cambios morfológicos y el rearrreglo del citoesqueleto. *P. gingivalis* no es considerada un patógeno intracelular, sin embargo existen evidencias de que es capaz de ser interiorizada a las células eucariotas. La interiorización de *P. gingivalis* ha sido demostrada en las células epiteliales y endoteliales, sin embargo, en los osteoblastos, aún se desconocen los mecanismos de interacción y las moléculas involucradas.

Este trabajo demuestra que *P. gingivalis* ATCC 33277 es capaz de infectar a los osteoblastos humanos MG-63 de línea celular, y que la bacteria es interiorizada por los osteoblastos y es eliminada dentro de las primeras 24 h. Además, la adición de inhibidores endocíticos como la Citocalasina D, inhibidor de actina; el Nocodazol, inhibidor de los microtúbulos; LY 294002, inhibidor de la PI 3-K y el Amilórido, inhibidor de la macropinocitosis, disminuyeron la interiorización de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos en un 29, 78, 62 y 63% respectivamente. La microscopía electrónica de barrido (MEB) y la microscopía de fluorescencia evidenciaron la interacción y el rearrreglo de las proteínas del citoesqueleto de los osteoblastos. Nosotros concluimos que la interiorización de *P. gingivialis* por los osteoblastos humanos se presenta en tiempos tempranos de la infección y la eliminación intracelular de la bacteria se presenta dentro de la primeras 24 h. Los inhibidores endocíticos demostraron que la interiorización de la bacteria por los osteoblastos humanos requiere de la participación de proteínas del citoesqueleto como los microtúbulos y los filamentos de actina, además la inhibición en la interiorización por el Amilórido, sugiere a la macropinocitosis como una de las vías endocíticas responsable de la captación de *P. gingivalis* por los osteoblastos, sin embargo, no descartamos la existencia de otras vías endocíticas que pudieran ser evidenciadas en estudios posteriores.

ABSTRACT.

Periodontal disease (periodontitis) is characterized by chronic inflammatory process and destruction of periodontal tissue, in severe cases induces teeth movement and loss. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), a Gram-negative strict anaerobe, is considered such as major agent in the ethnological development and progression of periodontal disease. To date is known that *P. gingivalis* is capable infect and internalize to epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts, this interaction induces morphological changes and the cytoskeletal rearrangement. *P. gingivalis* is not considered intracellular pathogen, however there are evidence that internalization occurs to eukaryotic cells. The internalization of *P. gingivalis*, have been demonstrated in epithelial and endothelial cells, however in osteoblasts are not yet known the mechanisms of interaction and involved molecules.

This work demonstrates that *P. gingivalis* ATCC 33277 is capable to infect to human osteoblasts MG-63 cell line and that the bacterium is internalized by osteoblasts and is eliminated into the first 24 h. Moreover the addition of endocytic inhibitors such as Cytochalasin D, an actin inhibitor; Nocodazole, a microtubules inhibitor; LY 294002, an inhibitor of PI 3-K and Amiloride, macropinocytosis inhibitor, diminished the internalization of *P. gingivalis* by human osteoblasts in a 29, 78, 62 and 63% respectively.

The electron scanning microscopy (SEM) and microscopy of fluorescence evidenced the interaction and rearrangement of osteoblasts cytoskeletal proteins.

We concluded that internalization of the *P. gingivalis* by human osteoblasts occurs in early times of infection and intracellular elimination of bacterium takes place into the first 24 h. The use of endocytic inhibitors demonstrated that internalization of bacterium in human osteoblasts require participation of cytoskeletal proteins such as microtubules and actin filaments, moreover the internalization inhibition by Amiloride suggested macropinocytosis as the endocytic pathway responsible of *P. gingivalis* uptake by human osteoblasts, however other endocytic pathways are not excluded.

INTRODUCCIÓN.

Microbiota de la cavidad oral.

La microbiota residente de la cavidad oral es una de las más variadas y numerosas en el organismo. Existen más de 500 bacterias en la cavidad oral, diversas especies de hongos, protozoarios y virus (Ruby et al., 2002).

El microambiente de la cavidad oral incluye a las superficies dentales, la encía, la mucosa, la lengua, la saliva y el fluido crevicular gingival (GCF) (Topazian et al., 2002; Michael et al., 2002). Se considera que al nacer, la cavidad oral es estéril, sin embargo, el número de microorganismos que ingresan en ella se eleva muy rápidamente (aproximadamente en 8 horas), siendo colonizada entonces por una gran variedad de microorganismos entre los que destacan los estreptococos, lactobacilos, estafilococos, *Veillonella*, *Neisseria* y organismos coliformes (Topazian et al., 2002).

Los estreptococos pueden comprender cerca del 80% de los microorganismos presentes en la cavidad oral, algunos ejemplos de ellos son: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y el grupo de *Streptococcus B*. También están presentes bacterias anaerobias, asociadas con la enfermedad periodontal: *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus* y *Prevotella intermedia*, entre otras cepas dominantes como *Candida albicans* y *C. parapsilosis*. La mayoría de los microorganismos de la cavidad oral utilizan a los carbohidratos de la dieta como su fuente principal de energía (Topazian et al., 2002).

El fluido crevicular gingival (GCF).

El GCF está compuesto de proteínas, carbohidratos (glucosa hexosamina) y minerales como el potasio y el calcio (Ruby et al., 2002). En el también están presentes citocinas como la interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, inmunoglobulinas de la clase G, (IgG), IgA e IgM, diversos antígenos y enzimas como las fosfatasas ácida y alcalina, colagenasas y condroitín sulfatasas (Michael et al., 2002).

En el GCF se encuentran células del linaje monocito/macrófago que pueden migrar hacia el tejido epitelial, linfocitos polimorfonucleares (PMNs), linfocitos T (LcT), linfocitos B (LcB) y células epiteliales (Topazian et al., 2002).

La saliva.

La saliva es un componente que puede brindar protección a la cavidad oral, favorece la autoclisis de los dientes y actúa como amortiguador del pH disminuyendo la acidez producida por las bacterias (Wang et al., 2002).

Entre las moléculas orgánicas presentes en la saliva están las lisozimas, mucinas, lactoferrina, mieloperoxidasas, amilasas, lactoperoxidasas, aglutininas, glicoproteínas, macroglobulinas β_2 , fibronectinas, IgA y en menor proporción IgG e IgM (Wang et al., 2002).

La fase inorgánica de la saliva está constituida por iones potasio, calcio, bicarbonato y gases como el sodio, el flúor, el amonio y el dióxido de carbono (CO_2) (Michael et al., 2002; Ruby et al., 2002).

Las histatinas de la saliva, son proteínas que poseen actividad bactericida contra microorganismos anaerobios. Las cistatinas, una familia de inhibidores de las cisteína proteasas, interfieren con el crecimiento de bacterias anaerobias. Las histatinas y las cistatinas pueden inhibir la actividad proteolítica de *P. gingivalis*. La lactoferrina en su forma apo (hierro no saturado), también retarda el crecimiento de estas bacterias. Las fibronectinas pueden adherirse a las fimbrias de *P. gingivalis* impidiendo que la bacteria se adhiera a las células eucariotas. Los receptores salivales para *P. gingivalis* como proteínas ricas en prolina, glicoproteínas y estaterinas, interactúan con las fimbrias de *P. gingivalis* (Lamont et al., 2000).

Sin embargo, la saliva también puede ser uno de los principales vectores de transmisión de *P. gingivalis* (Lamont et al., 2000), debido a que muchas de sus moléculas actúan como receptores que facilitan la adherencia de la bacteria (Lamont et al., 1998).

La enfermedad periodontal (periodontitis).

La enfermedad periodontal es una patología caracterizada por inflamación excesiva aguda o crónica de la encía, destrucción del tejido conectivo, el hueso alveolar y el cemento radicular (Mahanonda et al., 2007; Ruby et al., 2002).

La etiología de la periodontitis, se atribuye principalmente al complejo bacteriano gingival (biopelícula bacteriana). *P. gingivalis* es una bacteria Gram-negativa anaerobia estricta, considerada como el principal agente etiológico de la periodontitis (Yilmaz et al., 2008).

El desarrollo de la periodontitis cursa por diferentes etapas:

1) Formación del conglomerado bacteriano (más de 300 especies distintas), micoplasmas, levaduras y virus, en la superficie de los dientes y el área subgingival (Michael et al., 2002; Topazian et al., 2002; Lamont et al., 1998). La biopelícula bacteriana puede asociarse con la matriz intercelular (polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y lípidos) que favorece su desarrollo (Michael et al., 2002) (Topazian et al., 2002).

2) El desequilibrio en las concentraciones de calcio, fósforo, sodio, potasio y flúor de la matriz intercelular favorece la calcificación de la biopelícula bacteriana, a la cual se le llama sarro o tártaro dental, nicho para la colonización de *P. gingivalis* y otras bacterias anaerobias (Yilmaz et al., 2008). Los tejidos calcificados están expuestos a las secreciones salivales y al GCF que contienen moléculas que interactúan directamente con las bacterias favoreciendo su colonización en las superficies dentales y el área subgingival (Lamont et al., 2002).

3) Inducción excesiva del proceso inflamatorio (alta expresión de IL-1 β , factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interferón- γ (IFN- γ) e IL-8, moléculas que favorecen la activación y el reclutamiento de PMNs, monocitos, linfocitos y macrófagos (Silva et al., 2008; Mahanonda et al., 2007). Otras células fagocíticas no profesionales como los osteoblastos y los fibroblastos, así como LcT y LcB, expresan altos niveles del ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) en el periodonto (Silva et al., 2008; Cuttler et al., 2007; Kiji et al., 2007).

Los fibroblastos pueden presentar alteraciones citotóxicas, mientras tanto, el infiltrado celular, así como la degradación de la colágena progresan apicalmente hacia la zona radicular de los dientes (Schawartz et al., 1997).

El aumento en la síntesis de metaloproteinasas de matriz-13 (MMP-13) y las colagenasas bacterianas también son importantes en la destrucción progresiva del periodonto (Silva et al., 2008).

4) Desaparecen los osteoblastos de la cresta alveolar y los osteoclastos entonces la reabsorben, lo que induce la pérdida del anclaje de las fibras del periodonto. La superficie del cemento radicular es la última en reabsorberse debido a que este tejido se remodela más lentamente ya que posee más cantidad de flúor que el hueso, lo que le confiere mayor resistencia a la degradación de los ácidos por los osteoclastos (Schawartz et al., 1997).

El proceso inflamatorio, la degradación de los tejidos y la desadherencia del epitelio gingival al cemento radicular y a los tejidos de soporte, inducen la formación de sacos o bolsas periodontales, la conjugación de estos procesos culminan con la retracción del epitelio gingival, resorción ósea alveolar y en etapas tardías movilidad y pérdida de los dientes (Michael et al., 2002).

La periodontitis agresiva se caracteriza por una rápida desadherencia gingival, se subdivide en periodontitis prepubertal, juvenil y de ataque temprano (Yoshie et al., 2007). La periodontitis crónica o periodontitis adulta (pacientes de 35 años en adelante) es el tipo más frecuente y su progresión es más lenta, pero con altos niveles de destrucción de los tejidos periodontales y desadherencia gingival (Yoshie et al., 2007).

La enfermedad periodontal puede diagnosticarse clínicamente por la pérdida de la adherencia del epitelio gingival (Michael et al., 2002). Cambios morfológicos en la encía y la mucosa son importantes para el diagnóstico: color de la encía de rosa pálido a rojizo, hinchazón y consistencia flácida de la mucosa, sangrado espontáneo o inducido durante la masticación o el cepillado dental (Michael et al., 2002).

Susceptibilidad a la enfermedad periodontal.

El conocimiento de la dinámica de la microbiota oral y los factores que pueden predisponer la enfermedad periodontal puede ayudar en la comprensión de los procesos involucrados en esta patología. La cantidad de placa dentobacteriana no necesariamente está relacionada con la severidad de la enfermedad periodontal. Cada persona posee una curva de respuesta individual que define la susceptibilidad a la periodontitis (Yoshie et al., 2007). Se ha sugerido que la periodontitis puede estar relacionada genéticamente por mutaciones en diversos *loci* y estas variaciones genéticas podrían contribuir con el desarrollo de la patología (Yoshie et al., 2007). Además, *P. gingivalis* constantemente está sujeta a cambios en su microambiente que condicionan su supervivencia. En el área subgingival, la bacteria puede experimentar cambios drásticos como consecuencia de la alimentación del individuo, los patrones de higiene oral, los índices de variabilidad en el GCF y la saliva, así como los grados de sangrado presentes en la cavidad oral. En respuesta, la bacteria regula su expresión genética para mantener en óptimas condiciones sus propiedades fenotípicas (Lamont et al., 1998).

La temperatura gingival en individuos sanos es de 34 a 37°C, durante la periodontitis, la temperatura de la cavidad oral puede alcanzar los 39°C. Las altas temperaturas, pueden afectar expresión del gene de la fimbria principal (FimA) de *P. gingivalis*, sin embargo, la disminución en la expresión genética de la FimA se presenta en pleno desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que la fimbria de *P. gingivalis* es importante durante las etapas tempranas de la infección, facilitando la adherencia y la invasión a las células y que la posterior producción de la FimA tiene que ser reprimida para reducir en lo posible, los procesos de su eliminación (opsonización, quimiotaxis, inducción de citocinas e inmunogenicidad) (Lamont et al., 1998). Sin embargo la reducción en la expresión de fimbria no afecta la adherencia de la bacteria, ya que también cuenta con adhesinas que pueden activarse después de la adherencia inicial facilitada por la FimA (Lamont et al., 1998). Los polimorfismos genéticos en el perfil de las citocinas de los pacientes con periodontitis, también son un factor importante en la predisposición y el desarrollo de esta patología (Yoshie et al., 2007).

Las citocinas son moléculas proinflamatorias sintetizadas por células del sistema inmune (Dofferhoff et al., 1991; Guidet et al., 1993; Benjamini et al., 2000) como células linaje monocito/macrófago, linfocitos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DCs) y otras como las células endoteliales, los fibroblastos, los osteoblastos y los queratinocitos (Benjamini et al., 2000; Guidet et al., 1993; Dofferhoff et al., 1991). Estas moléculas solubles median interacciones locales durante la inflamación (Benjamini et al., 2000; Guidet et al., 1993; Dofferhoff et al., 1991). El aumento en la producción local de citocinas también puede tener efectos tóxicos y desencadenar la destrucción del tejido periodontal y del hueso alveolar (Michael et al., 2002; Benjamini et al., 2000; Guidet et al., 1993; Dofferhoff et al. 1991). Las prostaglandinas (PG's) también juegan un papel importante sobre los fibroblastos y las células óseas, regulando el sistema receptor activador del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK)/RANKL/ osteoprotegerina (OPG), favoreciendo la osteoclastogénesis (Graber et al., 2000; Garant et al., 2003).

Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis).

P. gingivalis es una bacteria gram-negativa anaerobia estricta, que puede ser capsulada, considerada por algunos autores como un cocobacilo corto no móvil y el principal agente causal de la enfermedad periodontal (Brunner et al., 2010). En la cavidad oral, *P. gingivalis* generalmente es un colonizador tardío o secundario y se considera que es una bacteria comensal en condiciones de salud pero bajo condiciones patológicas es considerada una bacteria oportunista (Cutler et al., 2007). Su nicho ecológico incluye a las superficies dentales, la mucosa oral y la lengua (Brunner et al., 2010).

P. gingivalis se adhiere a la saliva de las superficies dentales y para su colonización exitosa requiere de condiciones anaerobias que previamente otras bacterias le brindan al reducir las concentraciones de oxígeno (Lamont et al., 2000). Esta bacteria puede asociarse con estreptococos orales como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* o *Actinomyces naeslundii* (Lamont et al., 1998) y con otras bacterias anaerobias colonizadoras tardías como *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Treponema medium*, *Bacteroides forsythus*.

La interacción de este conglomerado bacteriano favorece su colonización, interrelación nutricional y los mecanismos de señalización intracelulares necesarios para su crecimiento (Lamont et al., 2000). El hierro es esencial para el crecimiento de *P. gingivalis*, utiliza a la hemina (protoporfirina de hierro IX) para satisfacer su requerimiento de hierro, el cual puede obtenerlo de diferentes moléculas: hemoglobina, haptoglobina, mioglobina, hemopexina, oxihemoglobina, albúmina, lactoperoxidasa, catalasa y el citocromo c (Lamont et al., 1998).

P. gingivalis almacena a la hemina superficialmente, lo que le brinda el característico pigmento negro a sus colonias. Se ha demostrado que existen diferentes proteínas de membrana involucradas en la unión y el transporte de la hemina hacia el interior de la bacteria. Esta bacteria también sintetiza hemolisinas asociadas a vesículas celulares que liberan a la hemoglobina de los eritrocitos así como diversas enzimas que degradan a las proteínas en péptidos pequeños de los cuáles obtiene carbono y nitrógeno. *P. gingivalis* no utiliza los substratos de azúcar como fuente de energía, sin embargo utiliza a la glucosa para la biosíntesis de macromoléculas intracelulares (Lamont et al., 1998).

P. gingivalis no se considera una bacteria intracelular, sin embargo, estudios de biología molecular y basados en anticuerpos, sugieren que la bacteria podría considerarse un patógeno intracelular y un habitante normal de la cavidad oral (Lamont et al., 2000). Como otras especies de bacterias patógenas, *P. gingivalis* puede adherirse a las proteínas de unión de las células epiteliales gingivales, por lo que se sugiere que puede interiorizarse en las profundidades del tejido conectivo a través de una vía paracelular y así destruirlo, sin embargo, en algunas ocasiones no necesariamente induce enfermedad (Kumagai et al., 2005) (Lamont et al., 2000).

P. gingivalis posee diversos factores de virulencia, como el lipopolisacárido (LPS), el ácido murámico, el polisacárido capsular (CPS), las fimbrias de superficie, proteasas como las gingipaínas, collagenasa PrtC, dipeptidil aminopeptidasa IV (DPPIV) y la serina proteasa tripeptidil proilil peptidasa; otros factores como los productos tóxicos de su metabolismo y los peptidoglicanos también son importantes (Yilmaz et al., 2008; Okahashi et al., 2004; Michael et al., 2002; Graves et al., 2001).

Las fimbrias, las gingipaínas, el LPS, el ácido murámico y el polisacárido capsular (CPS), pueden ser liberados extracelularmente en vesículas de membrana externa (MVs), degradando componentes y alterando la fisiología de algunas células eucariotas (Furuta et al., 2009).

El polisacárido capsular (CPS).

El polisacárido capsular (CPS) protege a las bacterias de la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, se ha demostrado que el CPS de *P. gingivalis* puede interferir en la unión de la bacteria con la célula que invade (Andrian et al., 2006). A diferencia de la Fim A, el CPS disminuye la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, lo que interfiere con la capacidad de la adherencia de la bacteria a las células eucariotas (Andrian et al., 2006). El CPS de *P. gingivalis* es un fuerte inductor de la respuesta inmune. Las cepas capsuladas de *P. gingivalis* y que son virulentas, se clasifican en seis serotipos distintos: K1-K6. El CPS del serotipo K1 (de la cepa W50) aumenta la expresión de citocinas en los macrófagos peritoneales. El CPS del serotipo K1 está constituido de ácido manurónico, ácido glucorónico, ácido galacturónico, galactosa y amino-acetilglucosamina (Andrian et al., 2006; Rajashri et al., 1998). Estudios recientes han demostrado que las cepas no capsuladas de *P. gingivalis* son más adherentes que las cepas capsuladas (Andrian et al., 2006). La digestión del CPS de *P. gingivalis* A7436 con amiloglucosidasa, incrementa hasta tres veces la invasión de esta bacteria a las células endoteliales de aorta bovina (BAEC), es posible que la digestión parcial de la cápsula de *P. gingivalis* ayude a “desenmascarar” o exponer a los ligandos y las fimbrias presentes en la superficie de *P. gingivalis*, facilitando su invasión a las células eucariotas (Rajashri et al., 1998).

El CPS de muchos microorganismos patógenos, se ha relacionado con la evasión de la respuesta inmune: opsonización, fagocitosis y la muerte por el complemento, sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que lo hace (Brunner et al., 2010).

Las fimbrias.

Las múltiples prolongaciones en la superficie *P. gingivalis* denominadas fimbrias de superficie favorecen su adhesión a proteínas y glicoproteínas ricas en prolina, fibrinógeno, fibronectina y lactoferrina; también participan en la adhesión e invasión de las células eucariotas como los fibroblastos, las células endoteliales, epiteliales, los eritrocitos así como de bacterias orales precedentes como estreptococos (Okahashi et al., 2004; Lamont et al., 2000; Lamont et al., 1998).

P. gingivalis posee una fimbria principal constituida de fimbrilina A (Fim A), un monómero de aproximadamente 43 kDa. Las fimbrias de *P. gingivalis* se clasifican en seis genotipos (del I al V y el 1b), basada en las diferentes secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para la Fim A, subunidad de la fimbria. La fimbria tipo II, es la más adhesiva e invasiva, *P. gingivalis* 33277 posee a la fimbria de tipo I (Kato et al., 2008; Andrian et al., 2006). Las fimbrias de *P. gingivalis* también poseen actividad quimiotáctica e inducen la expresión de citocinas. Estudios basados en microscopía electrónica han demostrado que existen fimbrias de menor tamaño en las superficie de *P. gingivalis*, denominadas fimbrias menores, compuestas de una proteína de 67 kDa, antigénicamente distinta de la Fim A (Lamont et al., 1998).

Las altas concentraciones de hemina son ideales para que *P. gingivalis* exprese fimbrias de superficie, pero las elevadas temperaturas en el tejido gingival ó las altas concentraciones de moléculas del suero, reducen la transcripción de la FimA (Lamont et al., 2000). La invasión de *P. gingivalis* esta mediada por la interacción de las fimbrias de superficie con los receptores de tipo integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ expresados en las células eucariotas, esta interacción activa a las proteínas de señalización de integrinas FAK (cinasas de adhesión focal) y paxilina y la remodelación de los filamentos de actina del citoesqueleto (CD11b/CD182) (Ling et al., 2008; Lamont et al., 1995).

Se sugiere que la interacción entre las fimbrias y los receptores de integrina $\beta 1$, en asociación con las balsas lipídicas de las membranas celulares, puede activar el rearrreglo del citoesqueleto, lo que permite la entrada de *P. gingivalis* (Yilmaz et al., 2008).

La invasión de *P. gingivalis* puede alcanzar la profundidad del ligamento periodontal y llegar hasta el hueso alveolar (Wang et al., 2002).

Se ha reportado que la fimbria de *P. gingivalis* induce la respuesta inflamatoria de las células eucariotas a través de la activación de TLR2 (Ohno et al., 2008). Existen características de adherencia relacionadas con el tipo de Fim A y con el de CPS. Por ejemplo: el CPS K1 con la Fim A IV; K2, K3 y K5 con la Fim A II y K6 para la FimA Ib. Se ha observado que la cepa de *P. gingivalis* que pertenece al tipo de CPS K2 con FimA II, se adhiere más eficientemente a las células epiteliales (Andrian et al., 2006).

Las hemaglutininas.

P. gingivalis también produce moléculas hemaglutinantes, debido a que utiliza el grupo hemo de la hemoglobina contenida en los eritrocitos para su crecimiento. Aunque la fimbria posee actividad hemaglutinante, las hemaglutininas principales son estructuralmente distintas a las fimbrias. Las hemaglutininas también pueden promover la colonización de la bacteria a través de su unión a receptores de oligosacáridos presentes en la superficie de las células eucariotas. La actividad hemaglutinante de *P. gingivalis* incluye un complejo hemaglutinina/LPS/lípidos de membrana, así como una forma de 40 kDa que puede ser liberada, llamada exohemaglutinina (Lamont et al., 1998).

Las proteasas (gingipaínas).

Las proteinasas semejantes a la tripsina (gingipaínas), son las enzimas responsables de la mayoría de las actividades proteolíticas extracelulares y unidas a membrana producidas por *P. gingivalis*. Tres genes diferentes codifican para proteinasas de cisteína específicas para: arginina-X (Arg-gingipaína A y B [rgpA y rgpB]) y las lisina-X (Lis-gingipaínas [kgp]) (Andrian et al., 2006; Okahashi et al., 2004; Michael et al., 2002; Lamont et al., 2000).

Las funciones de las proteasas de *P. gingivalis* son diversas, favorecen la degradación de proteínas, brindando los nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria, también participan en la invasión y destrucción de los tejidos, así como en la evasión y modulación del sistema inmune (Lamont et al., 2000).

La hidrólisis de la fibronectina o de la colágena por las gingipaínas-arg: RgpA y RgpB favorece la unión de las fimbrias a estos substratos (Lamont et al., 2000). RgpA y kgp, también participan en la lisis de los eritrocitos, la adhesión al grupo hemo y en la hemoaglutinación (Kato et al., 2008; Lamont et al., 2000).

Las gingipaínas degradan a proteínas de la matriz extracelular, activan a las metaloproteinasas de matriz, inactivan a los inhibidores de proteinasas plasmáticas, degradan a los receptores de superficie celular, componentes del complemento, citocinas, anticuerpos (Lamont et al., 1998), activan o inactivan a los factores del complemento y a algunas citocinas como TNF- α e IL-6, quimiocinas como IL-8 y la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1).

Estas proteinasas también estimulan la apoptosis de algunas células y alteran las funciones de los PMNs inhibiendo la producción de los iones superóxido (Kato et al., 2008; Michael et al., 2002; Topazian et al., 2002; Lamont et al., 2000).

Dipeptidil aminopeptidasa IV (DPPIV).

Kumagai et al., 2005, han demostrado que la DPPIV de *P. gingivalis*, participa en la degradación de la colágena induciendo la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) del tejido conectivo del huésped. La DPPIV se localiza en la cara externa de la membrana plasmática de la bacteria y su actividad se debe a su dominio extracelular. Esta molécula consta de una proteasa serina que se une en el extremo amino terminal de los dipéptidos X-Pro ó X-Ala de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de la matriz extracelular. La región carboxilo terminal de la DPPIV se ha asociado con actividad peptidasa. El tejido conectivo es rico en colágena tipo I y posee principalmente secuencias glicina-prolina, substratos potenciales a los que pueden unirse las peptidasas específicas de prolina como la DPPIV. La DPPIV también puede digerir a los productos de gelatina degradados por las MMP-2 y la MMP-9 (gelatinasas).

Aunque la degradación de la colágena se da principalmente por las MMP-1 y MMP-8 (colagenasas), la DPPIV interfiere en la interacción entre la fibronectina y el receptor $\alpha 5\beta 1$, la DPPIV podría hacer esto uniéndose al receptor $\alpha 5\beta 1$, lo que impediría que los fibroblastos se adhieran a la fibronectina alterando el equilibrio en la remodelación del tejido conectivo.

El lipopolisacárido (LPS).

El LPS de *P. gingivalis* es un complejo glicolipídico compuesto por una porción de polisacáridos hidrofílicos y un dominio hidrofóbico conocido como lípido A que es el responsable de la mayoría de los efectos biológicos inducidos por el LPS (Kikuchi et al., 2001), debido a que este por sí sólo posee poca actividad endotóxica, no obstante es altamente mitogénico (Hiroyuki et al., 1999).

El LPS se localiza en la cara exterior de la membrana externa de la bacteria y puede ser reconocido por el receptor CD14 expresado en las células del linaje monocito/macrófago, los PMNs y los fibroblastos.

Se sabe que el LPS es un potente inductor de la resorción ósea, la activación policlonal de linfocitos B, la inhibición de la aposición ósea y la proliferación de los fibroblastos (Wang et al., 2002; Hiroyuki et al., 1999). El LPS, a través de su lípido A, se une a la proteína unidora de LPS (LBP), una glicoproteína que se encuentra en la fase aguda y fase normal del suero, esta unión incrementa la sensibilidad de los monocitos/macrófagos y neutrófilos por el LPS.

Cuando el LPS es liberado desde la superficie de la bacteria, puede unirse al receptor CD14 en cualquiera de sus dos formas con ayuda de la LBP. El complejo LPS/CD14/LBP induce la activación de diversas proteínas cinasas como la proteína cinasa C, proteínas tirosinas cinasas y la proteína cinasa mitógeno activada (MAPK) (Wang et al., 2002).

El LPS también puede ser reconocido por el receptor tipo toll 4 (TLR4) expresado en las células dendríticas, los macrófagos, las células endoteliales y los fibroblastos gingivales (Ohno et al., 2008; Sun et al., 2008).

Sin embargo, TLR4 sólo, es incapaz de sensar y señalizar la presencia del LPS, por lo que requiere de la asociación de MD-2 para poder reconocer al LPS. Aunque TLR2 es capaz de mediar las señales inducidas por el LPS *in vivo*, su papel como receptor del LPS aún es cuestionado (Wang et al., 2002), se piensa que la heterogenicidad que posee el lípido A, favorece que el LPS pueda interactuar ya sea con TLR-4 ó TLR-2 (Mahanonda et al., 2007).

Estudios *in vitro* con macrófagos han demostrado que las proteínas asociadas al lípido A de *P. gingivalis* inducen la expresión de óxido nítrico sintasa-2 (NOS-2) y la liberación de óxido nítrico (NO) a través de las cascadas de señalización: factor nuclear (NF- κ B), proteína tirosina cinasa, proteína cinasa C, MAPK, c-Jun, ERK (quinasas reguladoras de señal extracelular) y p38 (Choi et al., 2007). El LPS de *P. gingivalis* difiere del de *E. coli* por algunas proteínas asociadas al lípido A, además cuenta con un único patrón de acilaciones de ácidos grasos y monofosforilaciones (Lamont et al., 1998).

Se ha observado que el LPS de *P. gingivalis* se une pobremente al LPB y por consiguiente es pobremente transferido hacia el receptor sCD14. *P. gingivalis* también puede facilitar su interiorización a los tejidos periodontales liberando su LPS dentro de vesículas de membrana externa, lo que le permite a la bacteria modular a distancia la respuesta inmune a su favor, ya que el LPS liberado funciona como señuelo evadiendo así la respuesta inmune específica, al evitar su opsonización y neutralización (Lamont et al., 1998).

Otros estudios han evidenciado que los macrófagos infectados con *P. gingivalis* expresan bajos niveles de TNF- α y PGE₂ (Wang et al., 2002), pero bajo el estímulo con el LPS de *P. gingivalis* expresan altos niveles de NO (Frolov et al., 1998).

Se ha demostrado que *P. gingivalis* puede salir de las células eucariotas e invadir a otras células no infectadas. Se desconocen aún los mecanismos precisos por los cuales la bacteria puede diseminarse, se sabe que la interacción célula-célula favorece la transmisión y la replicación de la bacteria, sin embargo esto no es indispensable para la transmisión e infección a otras células (Ling et al., 2008).

Una vez que *P. gingivalis* es interiorizada por las células eucariotas, la bacteria es capaz de evitar la respuesta inmune lo que puede explicar su diseminación local y sistémica (Yilmaz et al., 2008).

Parece ser que la capacidad de *P. gingivalis* para diseminarse intracelularmente es relativamente tardía, se ha detectado muy poca diseminación bacteriana en periodos tempranos de la infección, sin embargo después de las 24 hrs de infección puede observarse claramente la diseminación (Yilmaz et al., 2008).

Evasión de la respuesta inmune.

Se han estudiado diversos mecanismos por los cuales *P. gingivalis* puede evadir la respuesta del huésped ante la infección. La mayoría de las cepas de *P. gingivalis* poseen una cápsula de polisacáridos que les brinda resistencia a la fagocitosis.

La composición de los polisacáridos de la cápsula varía de una cepa a otra pero usualmente contienen altas proporciones de amino azúcares con glucosa y/o galactosa. Además, las propiedades hidrofílicas y aniónicas de los polisacáridos contrarrestan la adherencia de los neutrófilos y de los componentes del complemento (Lamont et al., 1998).

P. gingivalis puede residir dentro de los fagosomas de las células endoteliales y modificar su estructura para retrasar su fusión con los endolisosomas tardíos, evitando así su eliminación. Se sugiere que la bacteria podría dirigir la estructura del fagosoma en el que reside hacia un autolisosoma evitando así ser degradada, pero se desconocen los mecanismos por los que esto ocurre (Ling et al., 2008).

Otros estudios sugieren que *P. gingivalis* cuenta con una proteína citoplasmática llamada rubrertrina, que protege a la bacteria de las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidos por los PMN's, lo que favorece su proliferación intracelular (Giannopoulou et al., 2008).

El ácido butírico, que produce *P. gingivalis* induce la apoptosis de los linfocitos B y T. Cuando *P. gingivalis* es fagocitada, también produce superóxido dismutasa (SOD) que la protege de su eliminación dependiente del oxígeno, la SOD producida por *P. gingivalis* es de 21.5 kDa (Lamont et al., 1998).

En otros estudios se ha demostrado que algunas células infectadas por *P. gingivalis* no mueren por apoptosis o necrosis, debido a que la bacteria induce en ellas un fenotipo anti-apoptótico (Yilmaz et al., 2008). Se cree que los mecanismos que *P. gingivalis* utiliza para promover su sobrevivencia intracelular, involucran señales de activación de la cinasa PI3/AKT dependientes de mitocondria, la inhibición de la liberación de citocromo C, la despolarización de la membrana mitocondrial y la inhibición de la caspasa-3 (Yilmaz et al., 2008).

Se sugiere que la inducción anti-apoptótica por *P. gingivalis* representa una estrategia que le permite “ganar tiempo” para adaptarse y expresar las moléculas efectoras que le permiten colonizar, replicarse y dispersarse en los tejidos del huésped sin provocar la inducción completa de la respuesta inmune (Yilmaz et al., 2008). Sin embargo, Yilmaz et al., 2008, demostraron que *P. gingivalis* induce la apoptosis de los fibroblastos gingivales. Se sabe que los osteoblastos y los fibroblastos tienen la capacidad de reconocer al LPS y a las fimbrias de superficie *P. gingivalis* a través de TLR-4 (Ohno et al., 2008).

Interacción de *Porphyromonas gingivalis* con las células epiteliales.

El tejido epitelial gingival es un epitelio escamoso estratificado, el cual forma una barrera que protege al tejido periodontal de la invasión microbiana. Este tejido está constituido por células epiteliales gingivales y se divide en epitelio oral, sulcular y de unión. El epitelio sulcular se extiende desde epitelio oral hasta el surco de la encía por la parte interna, el epitelio de unión facilita la unión de los dientes con la encía y no está queratinizado (Andrian et al., 2006; Lamont et al., 1998).

El epitelio gingival funciona como “sensor”, alertando a las células del sistema inmune adyacentes de la infección bacteriana (Lamont et al., 1998). El tejido epitelial gingival generalmente es el primer tejido en ser infectado por *P. gingivalis* (Ling et al., 2008). La unión de *P. gingivalis* a las células epiteliales induce la formación de invaginaciones que rodean y engullen a la bacteria (Andrian et al., 2006).

P. gingivalis puede invadir diversos tipos de células epiteliales, algunos ejemplos de ellos son las células epiteliales gingivales de cultivo primario (GEC) y las células epiteliales de línea celular como las células KB (de carcinoma epidermoide). La invasión de las GEC es rápida y profusa, aproximadamente a los 15 min de infección puede observarse un alto número de bacterias en el área perinuclear. Una vez que *P. gingivalis* es interiorizada, puede encontrarse libre y viable en el citoplasma durante largos periodos, además puede modificar a los carbohidratos de superficie celular de las células e interferir con las vías de señalización dependientes de fosforilación para favorecer su invasión (Lamont et al., 2002).

La adhesión de *P. gingivalis* a las células epiteliales es facilitada por la interacción de su Fim A con los receptores $\beta 1$ integrina de la célula huésped, esta interacción activa la fosforilación de proteínas de adhesión focal como Paxilina y FAK (Lamont et al., 2002). La fosforilación de estas moléculas de señalización induce el rearrreglo del citoesqueleto (Ling L et al., 2008; Lamont et al., 1995). Además, la Fim A y el LPS reconocidos por TLR-2, pueden activar a NF- κ B e incrementar la expresión de IL-8 y MCP-1 (Ling et al., 2008; Andrian et al., 2006; Okahashi et al., 2004).

Sin embargo, en tiempos prolongados de la infección, *P. gingivalis* degrada a la IL-8 con ayuda de sus gingipaínas, inhibiendo además la expresión de la IL-8 aún en presencia de otros microorganismos como *F. nucleatum* (Lamont et al., 2002). Este desequilibrio en la expresión de IL-8, inhibe la transmigración de los neutrófilos, alterando la respuesta inmune innata en el periodonto (Andrian et al., 2006; Lamont et al., 2000).

También se ha demostrado que el LPS de *P. gingivalis* puede ser reconocido por receptor sCD14 en las células epiteliales ya que estas células carecen de mCD14 (Wang et al., 2002). La invasión de *P. gingivalis* a las células epiteliales, también induce la expresión las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Ling et al., 2008; Okahashi et al., 2004).

P. gingivalis puede replicarse dentro de las células epiteliales gingivales a partir de las 4 h de invasión (Ling et al., 2008; Lamont et al., 1995), posteriormente puede llegar a los tejidos subepiteliales a través de vías transcelulares o paracelulares (Yilmaz et al., 2008). La presencia de *P. gingivalis* dentro del epitelio gingival no necesariamente induce enfermedad (Yilmaz et al., 2008).

Estudios *in vitro* en los que Lamont et al. 1995, infectaron a las GEC con *P. gingivalis* (33277), utilizando una MOI de 100, demostraron que el número de bacterias intracelulares se incrementó de una manera dependiente del tiempo: a los 30, 60 y 90 min de infección. A partir de los 90 min realizaron ensayos de protección utilizando antibióticos y antifúngicos para eliminar a los microorganismos extracelulares, continuaron con una cinética post-infección hasta las 5 h, tiempo suficiente para la replicación de *P. gingivalis*.

Para determinar la participación del citoesqueleto en la interiorización de la bacteria, utilizaron los inhibidores: citocalacina D (inhibidor de los microfilamentos de actina) y Nocodazol (inhibidor de los microtúbulos).

Ambos inhibidores abolieron la interiorización de la bacteria, en un 93% y 88% respectivamente (Lamont et al., 2002), demostrando que los filamentos de actina y los microtúbulos son necesarios para la interiorización de *P. gingivalis* en las GEC. Existen algunas diferencias entre las células KB y las GEC durante la infección con *P. gingivalis*, en las células KB, la interiorización de la bacteria se da por la vía endocítica mediada por receptores y la fosforilación de tirosinas como MAPK ERK1/2, además, la bacteria puede encontrarse libre en el citoplasma así como dentro de vacuolas unidas a la membrana (esto último no se observa durante la invasión a las GEC) (Andrian et al., 2006; Lamont et al., 2002).

Las gingipaínas extracelulares RgpA, RgpB y Kgp de *P. gingivalis*, pueden degradar a las proteínas transmembranales de las células epiteliales, moléculas como las E-caderinas, β 1 integrinas, ocludinas y las moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) son degradadas (Yilmaz et al., 2008).

Las gingipaínas también pueden degradar a las moléculas de señalización de adhesión focal Paxilina y FAK, también son responsables de la inducción de la regulación de las moléculas de señalización MEK y ERK (Andrian et al., 2006).

La regulación de la producción de las MMPs en las células epiteliales gingivales se ve alterada por la invasión de *P. gingivalis* (Lamont et al., 2000). Durante el desarrollo de la periodontitis se expresan las MMP-1, -8 -9 y -13. Los cultivos de células epiteliales producen colagenasas y gelatinasas como la gelatinasa-1 (MMP-1), colagenasa-3 (MMP-13), gelatinasa A (MMP-2), gelatinasa B (MMP-9), y matrilisina (MMP-72003) (Andrian et al., 2006).

Las células epiteliales también pueden expresar MMPs in vivo. Estas enzimas degradan a las proteínas de la matriz extracelular como la colágena tipo I, III, y IV, fibronectina, elastina, entactina, y proteoglicanos. Las gingipaínas incrementan la expresión de MMP-8 y MMP-3 en las células epiteliales de mucosa de ratas y activan a MMP-1, -3 y -9 en su forma latente (Andrian et al., 2006).

Recientemente se ha identificado una molécula antiapoptótica conocida como P. g.-NKD, un homólogo distante del nucleósido difosfato cinasa (NKD) producido por bacterias oportunistas como *Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Yilmaz et al., (2008), demostraron que *P. gingivalis* también produce NKD y que inhibe la apoptosis de las células epiteliales gingivales activada por el receptor P2X₇. El NKD consume el ATP celular disponible evitando la activación de los receptores P2X₇. La interacción ATP/P2X₇ en los macrófagos, dispara la activación del inflamosoma, la secreción de IL-1 β y la inducción de apoptosis o necrosis. Parece ser que *P. gingivalis* podría utilizar esta vía para persistir dentro de las células epiteliales gingivales durante largos periodos y replicarse intracelularmente.

Además, se sabe que las GEC son tolerantes a altas concentraciones de *P. gingivalis*, aún a las 24 h de infección, estas células no pierden su viabilidad (Lamont et al., 2002).

Las GEC viven aproximadamente una semana y *P. gingivalis* ha desarrollado diferentes estrategias para evitar que la muerte de las células que invade, afecte su sobrevivencia. La bacteria es capaz de inhibir la apoptosis de las GEC a través de la inducción de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y camptotectina, también puede suprimir la síntesis de Bax (proteína proapoptótica) (Lamont et al., 2002).

Esto le permite a *P. gingivalis*, desarrollarse adecuadamente, ya que el microambiente celular representa una fuente rica de nutrimentos y un sitio inmunológicamente privilegiado (Lamont et al., 1998).

Estudios recientes han demostrado que las MVs de *P. gingivalis* pueden interiorizarse en las células HeLa (de carcinoma cervical) y en las células epiteliales gingivales humanas inmortalizadas (IHGE) de una manera dependiente de la Fim A. Una vez que son endocitadas, las MVs son separadas en compartimentos lisosomales, lo que podría sugerir su degradación, sin embargo, las MVs permanecen dentro de los compartimentos acidificados aún a las 24 hrs de ser interiorizadas, se sugiere que las MVs pueden inducir un tipo de estrés celular que altera la maquinaria digestiva celular, sin embargo esto no aún no está comprobado (Furuta et al., 2009).

Las gingipaínas kgp y Rgp presentes en las MVs de *P. gingivalis* degradan al receptor de la transferrina (TrF), que es un transportador de la transferrina, proteína indispensable para el metabolismo del hierro (proceso importante para la síntesis de DNA y ATP celular), también degradan a las moléculas de señalización relacionadas con la integrina como a la paxilina y a FAK, que regulan las adhesiones focales involucradas en el anclaje celular y la migración dirigida. Los inhibidores endocíticos: Citocalasina D y Wortmanina (inhibidor de la fosfatidil inositol 3 cinasa [PI3K]), impidieron la degradación de estas proteínas por las MVs, lo que sugiere que la adhesión de las MVs a la membrana plasmática puede ser facilitada por las balsas lipídicas. El Nocodazol no tuvo efecto (Furuta et al., 2009).

Las células epiteliales poseen péptidos antimicrobianos que contrarrestan la replicación intracelular de *P. gingivalis*. La calprotectina, un péptido antimicrobiano unido al calcio, se encuentra en el citosol de las células epiteliales inhibiendo la interiorización y replicación de *P. gingivalis* (Andrian et al., 2006). Las β -defensinas humanas (hBD), proteínas generalmente asociadas a la membrana de las células epiteliales, también impiden la replicación intracelular de la bacteria y previenen la destrucción de la célula infectada (Yilmaz et al., 2008; Andrian et al., 2006). Las β defensinas: hBD-1 hBD-2 hBD-3 son expresadas en las células epiteliales gingivales (Andrian et al., 2006).

Como se mencionó antes, los factores de virulencia de *P. gingivalis* son capaces de activar diferentes vías de señalización en las células eucariotas y se sabe que actúan selectivamente sobre componentes de las vías de señalización de las MAPKs (Lamont et al., 2000). La superfamilia de la MAPKs incluyen a la proteína cinasa c-Jun amino terminal activada por estrés (JNK), la cinasa reguladora de señal extracelular (ERK) y la MAP cinasa p38 (Andrian et al., 2006). La fosforilación de las MAPKs puede culminar con la activación y translocación de diversos substratos, incluyendo factores de transcripción como NF- κ B, otras cinasas y proteínas del citoesqueleto (Andrian et al., 2006). En las células epiteliales gingivales, *P. gingivalis* activa a JNK y desregula a la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK1/2), por lo que p38 y NF- κ B no son activados y la activación de JNK puede presentarse como consecuencia de la activación de GTPasas (Andrian et al., 2006).

Específicamente, la Fim A de *P. gingivalis* puede activar receptores de integrina en las células eucariotas, favoreciendo la interiorización de la bacteria. La invasión de la bacteria también induce la liberación de iones de calcio intracelulares, el aumento de los niveles de calcio citoplasmáticos favorece la señalización celular, lo que induce cambios morfológicos en el citoesqueleto y la expresión de factores de transcripción nucleares (Lamont et al., 2000).

La interiorización de *P. gingivalis* en estas células, también está relacionada con la fosforilación de tirosinas, la adición de Genisteína (un inhibidor de la tirosina cinasa), inhibe la interiorización de *P. gingivalis* en las células epiteliales (Andrian et al., 2006).

Además, la unión de la Fim A con el receptor de integrina β -1, induce la activación de señales río abajo que incluyen la fosforilación de las tirosinas cinasas de la adhesión focal como: la Paxilina y FAK, estas dos moléculas participan en la cascada de señalización mediada por integrinas, esta vía regula la adhesión, supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular (Andrian et al., 2006). La exposición prolongada de las células epiteliales con *P. gingivalis*, induce la disociación de los complejos de adhesión focal Paxilina y FAK, entonces son redistribuidas en el citoplasma, principalmente hacia el área perinuclear, esto coincide con la localización perinuclear de la bacteria. La formación de proteínas del citoesqueleto de adhesión focal mediada por receptores de integrina, está asociada de manera importante con la reorganización de los filamentos de actina y de los microtúbulos. *P. gingivalis* es incapaz de ser interiorizada por las células epiteliales que han sido tratadas con Colchicina y Nocodazol (inhibidores de la polimerización de los microtúbulos) (Andrian et al., 2006).

El aumento en las concentraciones de calcio (Ca^{2+}) intracelular es otro fenómeno asociado a la invasión de *P. gingivalis* en las células epiteliales. Este incremento en las concentraciones de Ca^{2+} resulta de la liberación de los iones calcio desde los almacenes intracelulares sensibles a tpsiarginina. *P. gingivalis* induce oscilaciones en los espacios citoplasmáticos y nucleares activando el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} presentes en las células epiteliales gingivales.

La fluctuación de los iones calcio en el citosol, son importantes mediadores de señalización que disparan cascadas de respuestas intracelulares que favorecen la remodelación del citoesqueleto (Fig. 1) (Andrian et al., 2006).

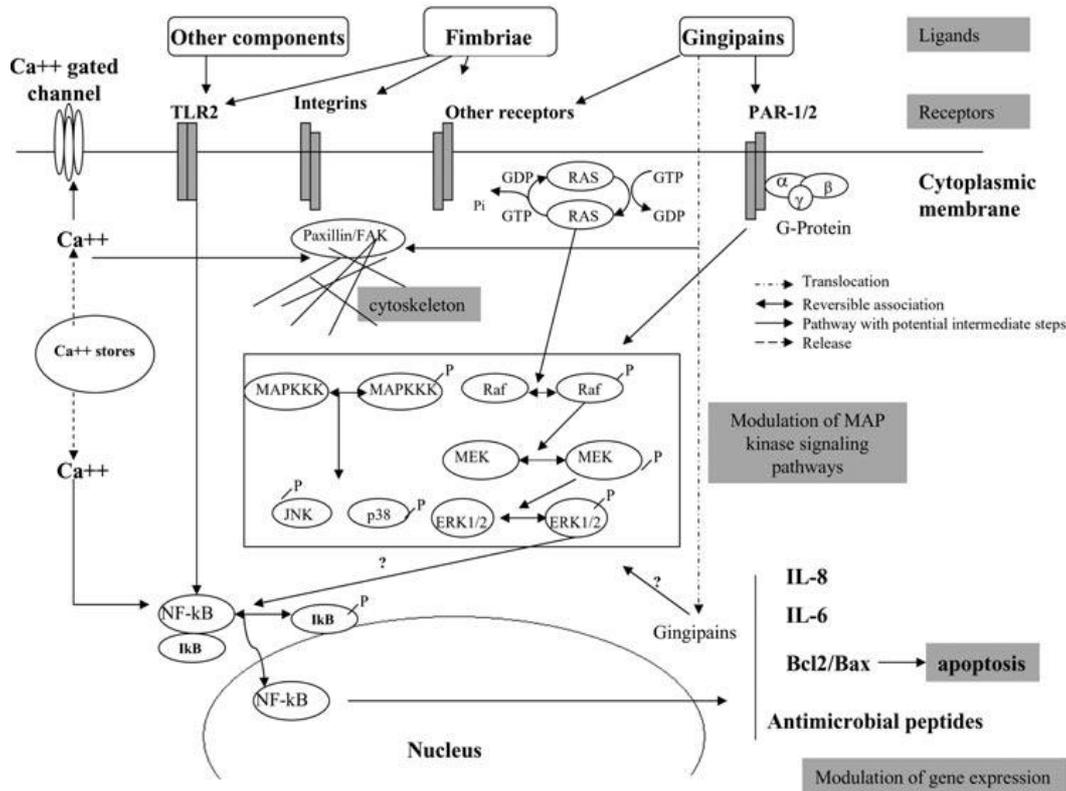


Fig. 1 Activación de diferentes vías de señalización en las células epiteliales por factores de virulencia de *P. gingivalis*.

Interacciones entre algunos factores de virulencia de *P. gingivalis* con receptores de superficie de las células epiteliales, por ejemplo TLR2, PAR-1/2, integrinas, etc. La interacción activa diferentes vías de señalización que culminan con la traslocación de factores nucleares como NF κ B y la síntesis de citoquinas. Tomado de Andrian et al., 2006.

Interacción de *Porphyromonas gingivalis* con las células endoteliales.

Diversos autores han demostrado que las MVs de *P. gingivalis* pueden invadir e interiorizarse en las células endoteliales de arterias coronarias humanas (HCAEC), células endoteliales del músculo liso de arterias coronarias (CASMC), células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC), células endoteliales de corazón bovino fetal (FBHEC) y células endoteliales de aorta bovina (BAEC) (Dorn et al., 1999; Rajashri et al., 1998).

Se sabe que el cepillado dental y/o el sangrado, favorecen la diseminación de *P. gingivalis* por la circulación sanguínea. Existe evidencia de que *P. gingivalis* puede encontrarse en sitios distantes al lugar común de infección, el corazón y las células endoteliales aórticas son ejemplo de ellos (Lamont et al., 2002). Se ha sugerido que la invasión de *P. gingivalis* a las células endoteliales y a las células del músculo liso, puede disparar el proceso inflamatorio que induce el desarrollo de la arteroesclerosis (Dorn et al., 1999).

La adición de inhibidores endocíticos como la Citocalasina D y el Nocodazol, reduce significativamente la invasión de *P. gingivalis* a las FBHEC, HUVEC y BAEC, esto indica que al igual que en las células epiteliales, el papel de los filamentos de actina y de los microtúbulos es importante en la interiorización de la bacteria (Rajashri et al., 1998).

A diferencia de las células mieloides, las células endoteliales carecen del receptor mCD14, por lo que reconocen al LPS de *P. gingivalis* a través del complejo sCD14/LBP (Wang et al., 2002). La invasión de *P. gingivalis* a las células endoteliales requiere de la adhesión de la FimA, adhesinas y/o invasinas y el rearrreglo del citoesqueleto (Lamont et al., 2002).

Se ha observado que cuando *P. gingivalis* es interiorizada en las células endoteliales, puede residir dentro de vacuolas multimembranosas casi idénticas a los fagosomas (Ling et al., 2008; Lamont et al., 2002). Además, se ha logrado determinar la sobrevivencia intracelular y la transmisión de *P. gingivalis* W83 en las células endoteliales (EC) y del músculo liso (SMC) de cultivos primarios, así como en células KB de línea celular.

La interiorización de *P. gingivalis* por las EC y SMC se puede observar aproximadamente en 10 min. La replicación de la bacteria se presenta en un tiempo de 4 a 5 hrs. En las células KB la invasión se presenta hasta las 3 hrs y el grado de transmisión se prolonga hasta las 24 y 48 hrs post-infección. En las células EC y SMC, el número de unidades formadoras de colonias (de sus siglas en inglés CFU) fue prácticamente nulo a las 24 hrs post-infección, sin embargo, bajo microscopía de fluorescencia, sí se pudo observar la presencia de *P. gingivalis* al mismo tiempo de infección (Ling et al., 2008).

Realizando co-cultivos con EC y SMC, se observó que *P. gingivalis* puede infectar a otras células sin haber tenido contacto directo con ellas, no obstante, el contacto célula-célula incrementó el rango de transmisión (Ling et al., 2008). Se desconoce el porqué no se pueden recuperar colonias de la bacteria sembrada en agar sangre a tiempos prolongados.

Estudios previos han demostrado la presencia de DNA genómico de *P. gingivalis* en arteriomas, sin embargo, no se pudieron cuantificar las UFCs de la bacteria (Ling et al., 2008). Se piensa que esto tal vez pueda deberse a la eliminación de *P. gingivalis* por la células huésped ó por abolición eliminación de los nutrientes intracelulares. Otra explicación sugiere que la transmisión célula-célula induce la interiorización de la bacteria pero en un estado latente, lo que podría impedir la obtención de UFCs.

Estudios con microarreglos demostraron que la mayoría de los genes reguladores de *P. gingivalis* son atenuados después de la invasión, tales genes están relacionados con la síntesis de proteínas, transcripción y metabolismo energético de la bacteria, lo que sugiere una reducción en el grado de crecimiento de la bacteria intracelular o un estado latente (Ling et al., 2008).

P. gingivalis 33277 sintetiza dihidroceramidas de fosfoglicerol libres y otros complejos lipídicos similares en estructura a las ceramidas de los mamíferos, las cuales participan regulando la diferenciación celular, la expresión genética y la apoptosis (Zahlten et al., 2007).

Algunos de estos complejos lipídicos se han obtenido desde cálculos radiculares, tejidos gingivales infectados y placas arterioescleróticas. La arterioesclerosis es una patología cardiovascular caracterizada por la acumulación de lípidos (principalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol), en las paredes arteriales (Zahlten et al., 2007). El desarrollo de lesiones arterioescleróticas induce el desarrollo del proceso inflamatorio que está acompañado por infiltración celular y en etapas avanzadas, la apoptosis de las células endoteliales (Zahlten et al., 2007).

Cuando se estimula a las células endoteliales de cordón umbilical con el extracto del lípido total, dihidroceramida fosfoglicerol y fracciones de fosfatidil etanolamina de *P. gingivalis* 33277, se induce la apoptosis de estas células, a las 5 h de exposición puede observarse la fragmentación de su DNA. Las procaspasas 3 y 9 también son activadas y los niveles de caspasa 6 se incrementan. Debido a que las dihidroceramidas activan a la caspasa 9, se sugiere que la mitocondria tenga una participación importante en este fenómeno. Además, estas fracciones lipídicas también pueden inducir la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células endoteliales (Zahlten et al., 2007).

Estudios recientes sugieren que la inducción de las células endoteliales con *P. gingivalis* favorece la expresión de mRNA para IL-8 y MCP-1 por estas células (Okahashi et al., 2004).

Se ha demostrado una fuerte relación entre la periodontitis y las enfermedades coronarias. En los pacientes con enfermedad periodontal, el sangrado derivado del proceso inflamatorio, la masticación y el cepillado dental, puede favorecer la entrada de *P. gingivalis* al torrente circulatorio (Dorn et al., 2001). *P. gingivalis* es un patógeno periodontal que sorpresivamente se ha encontrado en las placas arteroescleróticas. Dorn et al., 2001 estudiaron la invasión de *P. gingivalis* 381 en las células endoteliales de arteria coronaria humana (células HCAE), demostrando que después de la invasión, la bacteria se aloja dentro vacuolas morfológicamente idénticas a los autofagosomas (con dos membranas y con moléculas citoplasmáticas degradadas). En etapas tempranas de la interiorización, las vacuolas que alojan a *P. gingivalis* presentan Rab5 y HsGsa7p, en tiempos tardíos se determinó la presencia de BiP, y posteriormente la de la glicoproteína 120 lisosomal, sin embargo en estas vacuolas no se pudo determinar la presencia de marcadores endolisosomales tardíos como la Catepsina L lisosomal. Posiblemente el autofagosoma sea un nicho que favorece el establecimiento y la replicación intracelular de *P. gingivalis* (Dorn et al., 2001). Supresores del proceso autofágico como Wortmanina y 3-metiladenina, interfirieron con la presencia de *P. gingivalis* en los autofagosomas, favorecieron su interiorización en vacuolas morfológicamente distintas, con una sola membrana y carentes de sustancia citoplasmática degradada (Dorn et al., 2001).

Dentro de estas vacuolas, en tiempos tardíos de la invasión, se observaron fragmentos de la bacteria, lo que sugiere que la bacteria pudo ser degradada, además pudo determinarse la presencia de Catepsina L en estas vacuolas. Los inhibidores no tuvieron efecto en la interiorización de la bacteria en las células endoteliales (Dorn et al., 2001).

Estas observaciones sugieren que *P. gingivalis* es incapaz de bloquear su interiorización por la vía endocítica, sin embargo, tal vez es capaz de promover su entrada hacia la vía autofágica (Figura 2). Se piensa que el tránsito de las bacterias por la vía autofágica puede ser un mecanismo que eleva las concentraciones de aminoácidos libres que pueden ser utilizados por las bacterias para sus procesos bioquímicos y/o para inhibir la síntesis de proteínas de la célula huésped en respuesta a la invasión (Dorn et al., 2001).

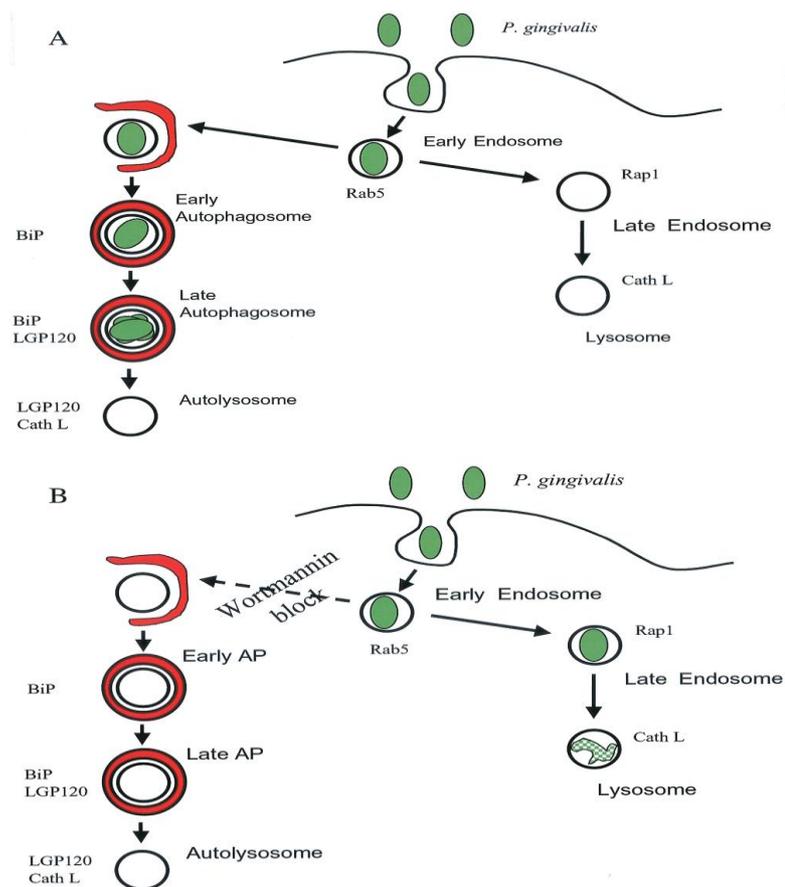


Fig. 2. Interiorización de *P. gingivalis* por las células endoteliales, vía autofagosómica. Parece ser que *P. gingivalis* puede dirigir su interiorización dentro de vesículas casi idénticas a autofagosomas en las células endoteliales sin ser degradada, estas vesículas no adquieren catepsina L. Además, la adición de Wortmanina (inhibidor de autofagia), induce la entrada de la bacteria en endolisosomas maduros, entonces *P. gingivalis* es degradada
Tomado de Dorn et al., 2001.

En un estudio reciente, Yamatake et al., 2007, demostraron que al infectar a las HAECs con las cepas de *P. gingivalis* 33277, 381, W83 y una cepa mutante para fimbria y gingipaínas (KDP136), las bacterias no fueron interiorizadas dentro de autofagosomas, la gran mayoría (90% aproximadamente), se pudieron encontrar en endolisosomas maduros positivos a catepsina B.

Al igual que Dorn et al., 2001 y Yamatake et al., 2007, determinaron la presencia de un marcador de autofagia (LC3-II), sin embargo, la presencia de este marcador sólo pudo observarse durante los primeros 30 min de infección con las cepas 33277 y KD136, los niveles de LC3-II disminuyeron a las 2 h postinfección. A las 6 h postinfección, LC3-II cayó a niveles inferiores de los basales y la colocalización con catepsina B, rápidamente indujo la formación de autolisosomas. La cepa 381 entró directamente a los autofagosomas, no así las cepas 33277, W83 y KDP136 no obstante la maquinaria autofagosómica había sido inducida de manera efectiva. Las gingipaínas no tuvieron efecto sobre el tráfico intracelular de *P. gingivalis*. La cepa KDP136 alojada en los fagolisosomas positivos a catepsina B, mostró pérdida de su estructura, lo que sugiere su gradual degradación. Las cepas 33277 y la 381, parecieron ser más resistentes a la degradación fagolisosomal en comparación de la cepa mutante, por lo que se sugiere que las gingipaínas tal vez sean importantes en la resistencia a la degradación por los fagolisosomas (Yamatake et al., 2007).

Parece ser que la infección de las HAECs con *P. gingivalis* 33277 y KD136 no altera el microambiente de los compartimentos fagolisomales, debido a que después de la infección, los niveles de catepsina B, D y L no difieren entre las HAECs infectadas con ambas cepas y con las células no infectadas. La viabilidad de *P. gingivalis* en los autofagolisosomas tampoco es afectada por la inhibición de los autofagosomas y el aumento de la secreción de hidrolasas lisosomales con Wortmanina y Bafilomicina A respectivamente. Esto sugiere que la bacteria posiblemente es eliminada por las especies reactivas del oxígeno y/o nitrógeno, así como por hidrólisis con hidrolasas lisosomales neutrales, además las gingipaínas probablemente puedan suprimir la generación de estas moléculas (Yamatake et al., 2007).

Interacción de *Porphyromonas gingivalis* con los fibroblastos.

Los fibroblastos gingivales son las principales células que componen al tejido conectivo, participan en el mantenimiento de la integridad del tejido gingival regulando el metabolismo de la colágena y de los proteoglicanos, cuando son estimulados con el LPS y otros factores de virulencia de *P. gingivalis* producen diferentes mediadores de la inflamación como interferón gamma (IFN- γ), PGE₂, IL-1, IL-6, TNF- α e IL-8 (Roberts et al., 2008; Mahanonda et al., 2007; Wang et al., 2002; Imatani et al., 2001; Tabeta et al., 2000).

Diversos trabajos han reportado la presencia del RANKL y de la OPG durante el proceso inflamatorio gingival. Estos estudios también demostraron la presencia de mRNA para la OPG en los fibroblastos gingivales humanos (HGF) estimulados con el LPS de *P. gingivalis*, la expresión de OPG y PGE₂ aumenta considerablemente, esto puede favorecer la aposición de hueso alveolar y reducir la osteoclastogénesis de manera importante, debido a que los HGFs constituyen el 65% de la población celular del tejido gingival (Kiji et al., 2007).

Graves et al., 2001, sugieren que el incremento en la expresión de TNF- α inducido por *P. gingivalis* puede ser más perjudicial que el daño producido directamente por los productos de la bacteria, la unión de TNF a los receptores tipo I de los fibroblastos, desencadena la activación de caspasas y la apoptosis de los fibroblastos.

Otros estudios sugieren que la expresión de IL-6 en los fibroblastos se debe más a la influencia de citocinas como la IL-1 y TNF- α , que a los efectos directos del LPS de *P. gingivalis* (Wang et al., 2002). Durante el proceso inflamatorio gingival puede presentarse reducción en el número de los fibroblastos y un incremento en el número de células apoptóticas incluyendo a los fibroblastos (Graves et al., 2001).

Se ha observado que el LPS de *P. gingivalis*, así como TNF- α ó IL-1, inducen un incremento considerable de IL-8 en los fibroblastos gingivales (Imatani T y cols. 2001), también se induce la expresión de IFN- γ lo que conduce a la inhibición de la proliferación de los linfocitos T en el periodonto (Mahanonda et al., 2007).

El polisacárido y las proteínas de la membrana externa de *P. gingivalis* también pueden inducir la expresión de IL-6 e IL-8 en los fibroblastos y parece que la expresión de IL-8 es mayor cuando los fibroblastos son estimulados únicamente con el polisacárido (Imatani et al., 2001). Los complejos lipídicos de *P. gingivalis* obtenidos de cálculos dentales y tejidos infectados también inducen la síntesis de IL-1 β y PGE₂ en los fibroblastos, alterando su morfología (Zahlten et al., 2007).

Diversos autores han demostrado que mCD14 es expresado en los fibroblastos y que puede reconocer al LPS de *P. gingivalis* mediando la activación celular, (Wang et al., 2002), sin embargo, el sCD14 no puede actuar de manera similar, ya que carece de dominios transmembranales y citoplasmáticos, por lo que es difícil que pueda inducir señales intracelulares (Tabeta et al., 2000).

La transducción de señales inducida por el LPS dispara cascadas de señalización intracelulares que conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B (Tabeta et al., 2000), la activación de esta vía induce la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6, así como en el inicio del proceso inflamatorio periodontal (Sun et al., 2008).

Las tirosinas cinasas inducidas por el LPS de *P. gingivalis* reconocido por CD14 en los fibroblastos gingivales, favorecen la expresión de MCP-1 a través de los factores de transcripción NF- κ B y la proteína-1 (AP-1) (Wang PL y cols. 2002). Existen diferentes vías de señalización que pueden ser activadas por el LPS: IKK-NF κ B, y tres vías proteína cinasas mitógeno activadas (MAPK): la vía de cinasas reguladoras de señal extracelular (ERK-1 y 2), la vía c-Jun cinasas terminal-N (JNK) y la vía p38. Estas vías a su vez, activan a diferentes factores de transcripción como NF κ B (p50p65) y AP-1 (c-Fos/cJun) (Sun et al., 2008).

Tabeta et al., 2000, proponen que el LPS también puede ser reconocido por la asociación de TLR2 y mCD14, debido a que los fibroblastos gingivales expresan TLR2 y TLR4 constitutivamente. TLR2 favorece la respuesta ante peptidoglicanos y lipoproteínas, TLR4 por su parte, puede reconocer al LPS (Wang et al., 2002).

Los receptores tipo Toll son un tipo de proteína transmembranal que poseen un dominio extracelular con secuencias repetidas ricas en leucina y un dominio citoplasmático con secuencia homóloga al receptor IL-1 humano (Wang et al., 2002). Otros experimentos han demostrado que cuando las células del ligamento periodontal son estimuladas con el LPS de bacterias gram-negativas, se incrementa la expresión de los TLRs 4, 5 y 7, así como la de las citocinas M-CSF, IL-2 e IL-6 (Sun et al., 2008).

Otros estudios realizados con el LPS de bacterias Gram-negativas, demuestran que induce la expresión de IL-8 en los fibroblastos gingivales humanos vía TLR-2 (Mahanonda et al., 2007). También se ha observado que cuando los fibroblastos gingivales son estimulados con el LPS de *P. gingivalis*, pueden expresar moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) vía sCD14 (Choi et al., 2007).

Urnowey et al., 2006, proponen que cuando se infecta a los fibroblastos gingivales humanos con *P. gingivalis*, se induce la expresión en estas células de genes anti y pro apoptóticos. Estudios previos han demostrado que cuando las gingipaínas-arg y lis de *P. gingivalis* se unen a la caspasa-3, pueden activarla e inducir la apoptosis. En este estudio pudo demostrarse que cuando los fibroblastos son estimulados con *P. gingivalis*, en tiempos tempranos (2-12 h), expresan genes pro-apoptóticos como: Bcl-XL, Bxl2, Bfl-1, Boo, survivina, entre otros.

Sin embargo entre las 24 y 36 h de infección, los genes pro-apoptóticos se apagaron y se activaron los genes anti-apoptóticos: Nip3, Hrk, Bax, Bik, Bok, Bcl-2, Bad, Bim y Moap-1. La apoptosis de los fibroblastos se caracterizó por la degradación del DNA nuclear y la activación de las caspasas 3, 6, 7 y 9 de la vía intrínseca mitocondrial. La inducción de los genes anti-apoptóticos durante la infección, se caracteriza por la activación de las vías de señalización de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), que a su vez induce la activación del factor de transcripción de supervivencia NF- κ B, al adicionar LY294002 (inhibidor de PI 3-K), se inhibió la fosforilación de I κ B en estas células.

Estudios recientes han demostrado que el CPS de *P. gingivalis* (W83), tiene la capacidad de modular la respuesta inmune. Cuando esta cepa invade a los fibroblastos gingivales, no se activa una respuesta proinflamatoria como normalmente sucede con una cepa WT ó una cepa mutante de *P. gingivalis* carente del CPS, además, esta última cepa induce una mayor expresión de IL-1 β , IL-6 e IL-8 que la cepa WT, en los fibroblastos gingivales. Parece ser que el CPS de *P. gingivalis* previene la activación del sistema inmune por la activación de los TLRs, que pueden reconocer al LPS, otro de los factores de virulencia de *P. gingivalis*.

Además, la cepa W83, posee muy pocas cantidades de fimbrias, y estas son muy cortas, por lo que se sugiere que el CPS cubre casi por completo a estas fimbrias, lo que favorece a la bacteria pasar inadvertida ante el sistema inmune.

Parece ser que el efecto del CPS en los fibroblatos gingivales está relacionado principalmente en la modulación de la respuesta inmune, debido a que no induce en estos una respuesta inmune intensa, conduciendo a una baja expresión de citocinas proinflamatorias, lo que posibilita a *P. gingivalis* evadir la respuesta inmune (Brunner et al., 2010).

Se sugiere que la capacidad que tiene *P. gingivalis* para retardar la apoptosis de las células que invade, le brindan la oportunidad de replicarse intracelularmente y protegerse de la respuesta citotóxica de la célula huésped.

En etapas tardías, cuando la célula huésped muere por apoptosis, la bacteria ya se ha podido replicar e incluso tal vez tenga la capacidad de destruir a su célula huésped y así poder invadir a otras células vecinas (Urnowey et al., 2006).

Interacción de *Porphyromonas gingivalis* con los Osteoblastos.

Poco se sabe de los efectos que posee *P. gingivalis* sobre los osteoblastos humanos, (Ohno et al., 2008). Se sabe que los factores de virulencia de *P. gingivalis* pueden alterar la fisiología de los osteoblastos (Lamont et al., 1998) y que la síntesis de PGE₂ inhibe la expresión de OPG en los osteoblastos y en las células del ligamento periodontal (Kiji et al., 2007). Suda et al., 2004, observaron que los osteoblastos estimulados con el LPS de bacterias anaerobias sintetizan PGE₂ (Hiroyuki et al., 1999; Lamont et al., 1998).

La IL-1 y el LPS inducen la osteoclastogénesis por dos mecanismos paralelos: incrementando la expresión de RANKL y suprimiendo la de OPG en los osteoblastos.

La fimbria principal de *P. gingivalis* induce a los osteoblastos, fibroblastos monocitos y macrófagos para que sinteticen PGE₂, IL-1 β y TNF- α , favoreciendo de manera indirecta la osteoclastogénesis (Hiroyuki et al., 1999; Lamont et al., 1998).

Se ha observado que cuando los osteoblastos de línea celular estromal derivados de médula ósea de ratón (ST2) son infectados con *P. gingivalis* 33277, se activa la expresión de RANTES/CCL5, IP10/CXCL10, MCP-1/CCL2, y la metaloproteinasas de matriz-9 (MMP9) y MMP13; parece ser que la expresión de RANTES y MMP9 es activada por el factor de transcripción NF- κ B, y se sugiere que la activación de RANTES es independiente de la vía Myd88. La activación celular puede inducirse a través de la vía TLR/Myd88, pero también por los receptores activados por proteasas (PARs) y las proteínas que contiene un dominio oligomerización unido a nucleótidos (NODs). La expresión de CXCL10 podría estar más relacionada con la activación de los PARs que con la vía NF- κ B durante la infección de los osteoblastos con *P. gingivalis* (Ohno et al., 2008). Los osteoblastos expresan PAR-2 que es activado por las gingipaínas induciendo la expresión de RANKL (Okahashi et al., 2004).

NOD1 y NOD2 son moléculas del sistema inmune innato que funcionan como sensores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como los peptidoglicanos. Los osteoblastos también expresan NOD2 y sus señales se han relacionado con la expresión del RANKL, activadas por el dipéptido muramil (unidad estructural del peptidoglicano) (Ohno et al., 2008).

Otra vía involucrada en la expresión del RANKL en los osteoblastos infectados con *P. gingivalis* es la vía de AP-1, se piensa que las gingipaínas son las principales inductoras de esta respuesta (Ohno et al., 2008; Okahashi et al., 2004).

El RANKL es una molécula transmembranal de la superfamilia de los ligandos de TNF expresada por los osteoblastos, esencial para la diferenciación de los osteoclastos en presencia del M-CSF (Ohno et al., 2008).

Posiblemente la degradación proteolítica de las cinasas de adhesión focal de los osteoblastos y las integrinas, disparen respuestas de estrés como la activación de AP-1 (Okahashi et al., 2004).

Otros estudios utilizando ensayos con microscopía confocal han demostrado que *P. gingivalis* 33277 se adhiere e invade a los osteoblastos de cultivo primario de ratón y que el máximo nivel de invasión se presenta utilizando una MOI de 100. Estos osteoblastos expresaron altos niveles de mRNA para IL-6, pero no para IL-1 β y TNF- α (Okahashi et al., 2004).

El LPS de *P. gingivalis* está asociado con el proceso inflamatorio y la destrucción del tejido periodontal (Kadono et al., 1999), induce la liberación de citocinas como IL-1 e IL-6 y de factores locales desde las células del tejido óseo y periodontal, estimulando la diferenciación osteoclástica y la resorción ósea alveolar (Okahashi et al., 2004; Kadono et al., 1999). Se sugiere que la activación del RANKL en los osteoblastos de línea celular ST2 (Kikuchi et al., 2001) y la de los osteoclastos generados en co-cultivo con osteoblastos infectados con el LPS de bacterias Gram-negativas es inducida por la vía de TLR4 en ambos tipos celulares (Zou et al., 2003). El LPS de *P. gingivalis* induce la proliferación de las células progenitoras osteoblásticas del hueso alveolar, pero retarda su diferenciación, la disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina es un reflejo de ello (Roberts et al., 2008). La expresión de los proteoglicanos como las decorinas y los biglicanos también es alterada por el LPS. (Roberts et al., 2008). La decorina y los biglicanos participan en la mineralización de la matriz ósea y la señalización celular, modulan la diferenciación osteoblástica a través de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), inducen la expresión de TGF- β y TNF- α en la matriz ósea y regulan la formación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita (Roberts et al., 2008).

El LPS retarda y reduce la expresión de estos proteoglicanos en las células del linaje osteoblástico (Roberts et al., 2008). Kadono et al., 1999, observaron que el LPS también puede inhibir la producción de osteocalcina y osteopontina en el hueso de ratas.

Sin embargo, el extracto del LPS, incrementa la expresión de mRNA para CD14 e IL-1 β en los osteoblastos de feto rata. Otros estudios *in vitro* con osteoblastos, sugieren que el LPS inhibe la síntesis de colágena tipo I, la actividad de la fosfatasa alcalina, la acumulación de calcio y fosfato inorgánico e induce la producción de metaloproteinasas que degradan los tejidos óseo y periodontal (Hiroyuki et al., 1999; Kadono et al., 1999).

Kato et al., 2008, estudiaron los efectos del ciclo celular de los osteoblastos ST2 infectados con *P. gingivalis* (33277) y otras cepas deficientes para gingipaínas y para fimbria. Demostraron que a las 24 horas de infección, la cepa deficiente de fimbria (KDP150), inhibió significativamente la proliferación de las ST2, deteniendo su crecimiento en las fase G₀/G₁, las ciclinas D y E, reguladoras del ciclo celular, también disminuyeron significativamente. Las cepas KDP129 Y KDP133, deficientes para gingipaínas, también detuvieron el crecimiento celular en la fase G₁, KDP129 fue más eficiente pero la detención en el ciclo celular fue mucho menor en comparación a las cepas 33277 wilde type (WT) y KDP150. Además, observaron aumento en la expresión de TGF β 1 y TGF β 2, moléculas con efectos antiproliferativos, sin embargo, las ciclinas D1, D2 y E2, las cuales son activadoras del ciclo celular, fueron disminuidas considerablemente.

El que *P. gingivalis* sea capaz de modificar el ciclo celular de los osteoblastos puede significar una ventaja importante para su sobrevivencia intracelular. La detención de las células en la fase G₁ por *P. gingivalis* impide a los osteoblastos que alcancen las fases G₁/S, importantes para asegurar la calidad del material genético y el crecimiento celular (Kato et al., 2008). La detención del ciclo celular disminuye la intensidad metabólica, lo que reduce los niveles de respuesta inmune innata, como la producción de citocinas y el mecanismo lisosomal para la eliminación de microorganismos patógenos interiorizados en las células (Kato et al., 2008).

Algunos estudios han demostrado que la infección con bacterias Gram-negativas puede provocar detención del ciclo celular en la fase G₂/M impidiendo que las células reingresen a la fase G₁ provocando alta actividad mitótica e incrementando la probabilidad de que se generen células malignas (Kato et al., 2008).

JUSTIFICACIÓN.

La importancia de conocer los mecanismos por los que *P. gingivalis* infecta y es interiorizada por los osteoblastos humanos facilitará el entendimiento de los procesos patológicos que alteran el metabolismo del tejido periodontal, esto podría facilitar el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos dirigidos a la prevención de la periodontitis.

HIPÓTESIS.

La entrada de *P. gingivalis* inducirá su entrada a los osteoblastos humanos ocurre través de un mecanismo endocítico e involucra la participación de proteínas del citoesqueleto.

OBJETIVOS.

General.

Estudiar la infección por *P. gingivalis* en los osteoblastos humanos y dilucidar los eventos endocíticos responsables de su entrada.

Particulares.

- Determinar la infección de *P. gingivalis* en los osteoblastos humanos.
- Establecer el mecanismo de entrada de *P. gingivalis* en los osteoblastos humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Línea celular.

Osteoblastos humanos MG-63, se cultivaron en medio mínimo esencial modificación alfa (MEM/alfa) (HyClone) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA-The cell culture company) a 37° C y 5% de CO₂.

Bacteria.

Porphyromonas gingivalis de la cepa ATCC 33277 liofilizada fue recuperada con 2 mL de caldo de soya tripticasa, la suspensión homogeneizada se sembró en tubos con medio de tioglicolato con carne cocida y en placas con agar sangre suplementado con hemina y menadiona al 1% (ASHM) (DIFCO). Las placas sembradas se colocaron en una jarra con el sistema de anaerobiosis Gaspak y se incubaron a 37°C. Paralelamente se incubaron placas sembradas en condiciones aerobias a 37°C, para corroborar el requerimiento de anaerobiosis de la bacteria. Los tubos de medio tioglicolato se incubaron también a 37°C. A las 72 h de incubación, se verificó el crecimiento de la bacteria en las placas de ASHM y en los tubos con tioglicolato. Posteriormente, se evidenció el crecimiento de *P. gingivalis* y la pureza del cultivo se verificó mediante morfología colonial y por tinción de Gram.

Para los ensayos de infección, el cultivo bacteriano en fase logarítmica se centrifugó y se lavó dos veces con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (SIGMA), el botón bacteriano se ajustó al tubo No. 1 del nefelómetro de Mc Farland con HBSS y se realizó la dilución necesaria para alcanzar una MOI de 100.

Preparación de las monocapas.

Las monocapas celulares se realizaron a partir de células tomadas de botellas de cultivo que fueron despegadas por incubación de 2-3 min con solución de tripsina (al 5%) en EDTA, las células suspendidas se centrifugaron a 1 500 rpm/5 min, el botón celular se resuspendió en un volumen de medio conocido y se contaron en una cámara de Neubauer (HAUSSER), haciendo una dilución 1:20 con azul tripano al 0.04%. Dependiendo del ensayo se realizaron las diluciones correspondientes en MEM- α suplementado con 10% de SFB para ajustar el número de células requeridas.

Determinación de unidades formadoras de colonias de *P. gingivalis* en osteoblastos humanos.

Monocapas confluentes de osteoblastos humanos preparadas en placas de 24 pozos se lavaron dos veces para eliminar las células no adheridas y se incubaron con la suspensión bacteriana a una MOI de 100 siguiendo una cinética de infección de 1, 1.5, y 2 h y 5, 7 y 24 h de post-infección a 37° C. Transcurrido el período de infección las monocapas se lavaron 3 veces con HBSS y para eliminar a las bacterias no interiorizadas las monocapas se trataron con una mezcla de antibióticos (gentamicina 300 μ g/metronidazol 200 μ g) durante 1 h. Posteriormente, las células se lisaron con agua destilada y diluciones seriadas de los lisados con factor 10 se sembraron en placas de ASHM, dichas placas se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C para determinar las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Efecto de los inhibidores endocíticos en la interiorización de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos.

Para determinar el efecto de diversos inhibidores endocíticos sobre la entrada de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos, se realizaron monocapas de osteoblastos en placas de 24 pozos a una confluencia de 80-90%.

Antes de la infección, las monocapas se trataron durante 1 h con diferentes concentraciones de los inhibidores endocíticos (Tabla 1): Citocalasina D (inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina) (SIGMA), Nocodazol y Colchicina (inhibidores de microtúbulos) (SIGMA), Amilórico (inhibidor de la macropinocitosis), Wortmanina (SIGMA) y LY294002 (inhibidores de la fosfatidil inositol 3 cinasa/PI 3-K) (SIGMA). Transcurrido este periodo de incubación, las células se infectaron con la suspensión bacteriana a una MOI de 100 durante 2 h en presencia de los inhibidores. Paralelamente se infectaron células en ausencia de inhibidor para establecer el número de unidades formadoras de colonias. Después de la infección, las monocapas se lavaron 3 veces con HBSS y se trataron con la mezcla de antibióticos (gentamicina-metronidazol) durante 1 h.

A partir de los lisados se realizaron diluciones seriadas con factor 10, se sembraron en placas de ASHM y se incubaron en condiciones anaerobias para cuantificar las UFC/mL.

Para verificar que los inhibidores endocíticos no presentaran efecto sobre la viabilidad celular, a las monocapas preparadas se les adicionó la concentración más alta de cada uno de los inhibidores y se incubaron durante 4 h a 37°C, posteriormente, se lavaron dos veces con HBSS y se les adicionó 10 µl de azul tripano al 0.4%. Cada uno de los pozos, con el correspondiente inhibidor, se analizó bajo un microscopio óptico convencional (Zeiss). La viabilidad se estimó cuantificando 200 células y calculando el porcentaje de células que excluyeron el colorante.

TABLA 1. CONCENTRACIONES DE INHIBIDORES ENDOCÍTICOS	
INHIBIDOR	CONCENTRACIONES (µM)
Citocalasina D (2 mM)	0.5, 1 y 2
Colchicina (10 mM)	2.5, 5 y 10
Nocodazol (20 mM)	5, 10 y 20
Wortmanina (2 mM)	1, 1.5 y 2
LY294002 (15 mM)	5, 10 y 15
Amilórico (200 mM)	100, 200 y 300

Microscopía óptica de la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

Para evidenciar la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos se realizó una cinética de infección. Para ello, se realizaron monocapas sobre cubreobjetos de vidrio a una confluencia de 60-70%, las cuales se lavaron dos veces con HBSS para eliminar las células no adheridas. La infección celular se realizó siguiendo el método descrito anteriormente a una MOI de 100 y siguiendo una cinética de infección de 1, 1.5 y 2 h y tiempos post-infección de 5, 7, 24 y 48 h.

Después de cada tiempo de infección las monocapas se trataron con una mezcla de antibióticos (gentamicina 300 µg/metronidazol 200 µg) durante 1 h.

Posteriormente, las monocapas se lavaron dos veces con HBSS, se fijaron con 0.5 mL de metanol frío durante 10 min a temperatura ambiente y se tiñeron durante 4 min con hematoxilina (SIGMA), se lavaron con agua corriente, posteriormente se tiñieron con eosina (SIGMA) durante 1 min, se lavaron con agua corriente y se tiñieron con fuscina (SIGMA) durante 1 min. Finalmente se lavaron con 0.5 ml de alcohol-xilol y se aclararon con xilol durante 1 min. Las muestras se montaron sobre portaobjetos con resina y se analizaron bajo un microscopio óptico (NIKON ECLIPSE-E400).

Participación del citoesqueleto en la entrada de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos.

Para establecer el papel de los filamentos de actina y de los microtúbulos en la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos, se realizaron ensayos de microscopía de fluorescencia. Para este fin, se prepararon monocapas sobre cubreobjetos de vidrio a una confluencia de 70%, las cuales se incubaron durante 1, 1.5 y 2 h con una suspensión bacteriana a una MOI de 100, la cual previamente se había teñido con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA).

Para la tinción de la bacteria se partió de 2 mL de un cultivo bacteriano en fase logarítmica, el cual se centrifugó y se lavo dos veces con HBSS, el botón bacteriano se resuspendió con 200 μ L de FITC a una concentración de 1 μ g/mL y se incubó durante 20 min a 37°C, después de la incubación, el FITC se eliminó mediante 5 lavados con HBSS hasta que el sobrenadante correspondiente al último lavado no dio lectura fluorescente a 530 nm en un fluorómetro (Fluoroskan Assent FL).

Para la determinación de la participación de los filamentos de actina en la interiorización de la bacteria, las monocapas infectadas se lavaron 3 veces con HBSS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente, el exceso de paraformaldehído se eliminó lavando las monocapas 3 veces con PBS, una vez lavadas las monocapas se tiñeron con faloidina-rodaminada (SIGMA) a una concentración de 150 ng/muestra durante 20 min.

Las monocapas teñidas se lavaron con PBS para eliminar el exceso de faloidina y se montaron sobre portaobjetos con vectashiel-DAPI (VECTOR). Para determinar la participación de los microtúbulos se siguió el mismo procedimiento de infección y fijación, después del cual, las monocapas se permeabilizaron con duodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1% durante 5 min y tritón X-100 al 0.2% durante 5 min, para bloquear los sitios antigénicos no relacionados se utilizó albúmina al 3% durante 20 min. Posteriormente, las monocapas se incubaron con 2.0 mg/ml de anticuerpo anti-tubulina (SIGMA) marcado con FITC durante 1 h, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando las monocapas 4 veces con PBS. Finalmente, las monocapas se montaron sobre portaobjetos con Vectashield-DAPI. Tanto las preparaciones teñidas para visualizar filamentos de actina como las teñidas para visualizar microtúbulos se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia (NIKON-Eclipse, E800).

Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

Para evidenciar ultraestructuralmente la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos se realizaron ensayos de MEB.

Monocapas de osteoblastos humanos preparadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio (1 cm de diámetro) se infectaron con la suspensión bacteriana a una MOI de 100, durante 30 min, 1.5, 2, 5 y 7 h. Posteriormente las monocapas se fijaron con 1 ml de glutaraldehído (EMS) al 2.5% durante 2 h a temperatura ambiente, las monocapas fijadas se lavaron 3 veces con 1 mL de solución lavadora y se post-fijaron con 1 mL de tetróxido de osmio al 1% (EMS). Las monocapas fijadas y postfijadas se sometieron a una deshidratación gradual con concentraciones ascendentes de alcohol etílico absoluto. Una vez deshidratadas, las muestras se secaron al punto crítico con CO₂ líquido en un equipo secador de punto crítico (SANDRI-780B) para finalmente recubrirse de oro en una ionizadora de oro (DENTUM VACUUM-Desk II). Una vez que las muestras se montaron sobre portamuestras de aluminio, se analizaron bajo un microscopio electrónico de barrido (JEOL-JSM5800LV).

RESULTADOS.

Evaluación macroscópica y microscópica de la cepa bacteriana.

Con el fin de corroborar la pureza bacteriana, se analizó la morfología colonial de las colonias en las placas de ASHM, la cual coincidió con la morfología reportada para *P. gingivalis*: colonias puntiformes, circulares, convexas, brillantes, translúcidas, de consistencia suave y con la presencia de un pigmento negro. Microscópicamente, la morfología de *P. gingivalis* coincidió con la de un bacilo aislado, corto y Gram-negativo (Fig. 3). La ausencia de crecimiento en las placas de agar sangre incubadas en condiciones aeróbicas confirmó que la bacteria es anaerobia estricta.

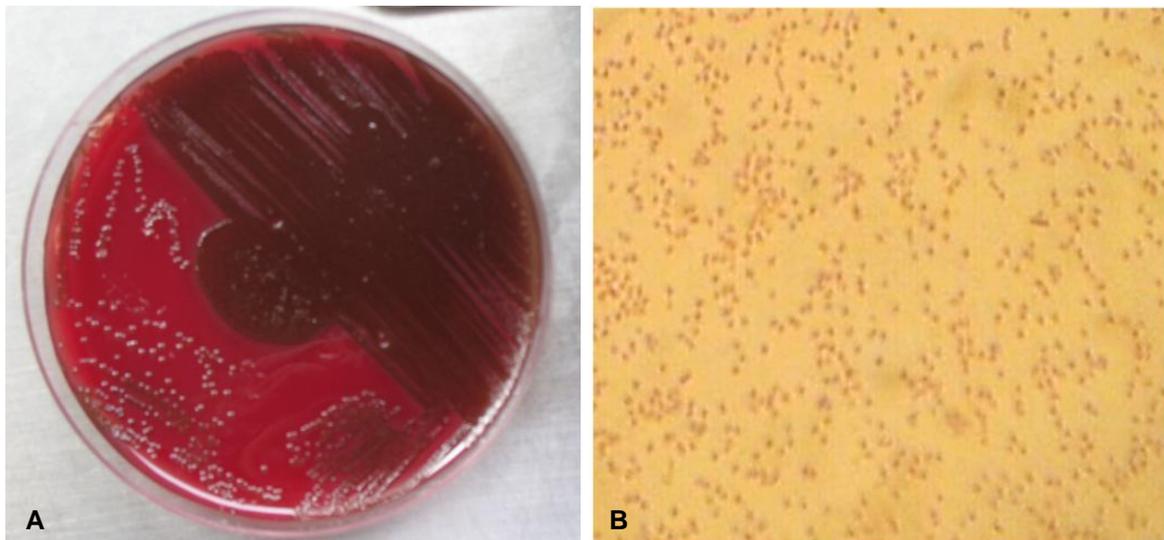


Fig. 3. Morfología macroscópica y microscópica de *P. gingivalis*.

A) Morfología colonial de *P. gingivalis* en placas de ASHM,

B) Bacilos cortos Gram negativos (100X).

Sobrevida de *P. gingivalis* en los osteoblastos humanos.

Los resultados obtenidos en las cinéticas de infección de los osteoblastos humanos infectados por *P. gingivalis* demuestran que el número de bacterias interiorizadas no presentan cambios durante las primeras 2 h de infección, ya que prácticamente se contaron el mismo número de UFCs. Los tiempos post-infección, evidenciaron que a partir de las 5 h de post-infección disminuyeron las UFC cuantificadas, tendencia que continuó hasta las 24 h, tiempo en el que prácticamente no se cuantificaron UFCs (Fig. 4).

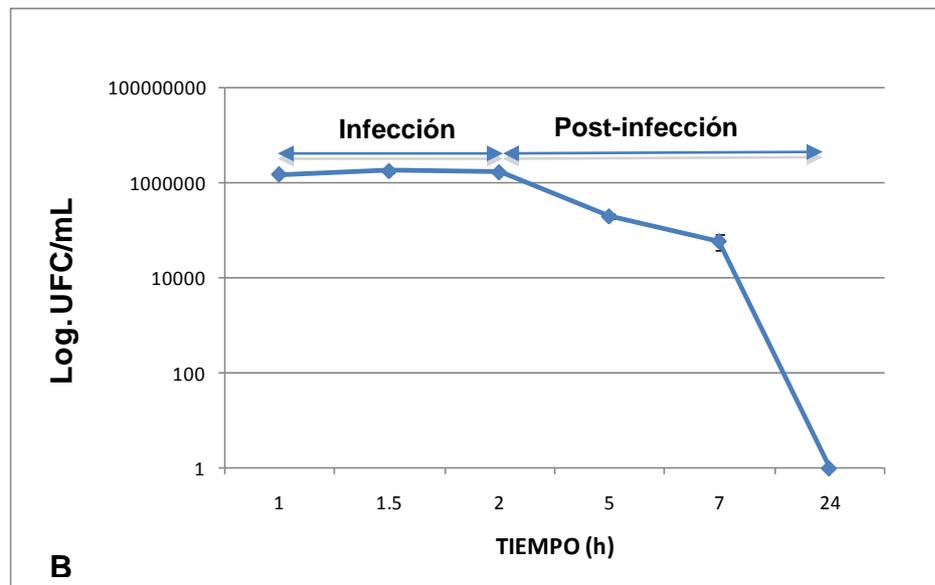
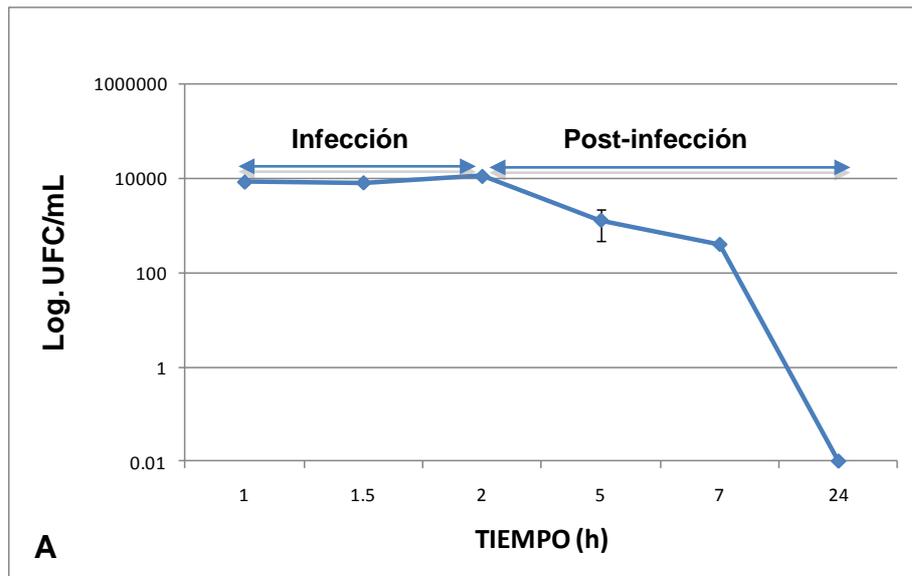


Fig. 4. Cinéticas de infección de *P. gingivalis* en osteoblastos humanos
A y B son dos experimentos independientes que demuestran la interiorización de la bacteria por los osteoblastos humanos en tiempos tempranos (1-2 h) y la disminución en el número de UFCs en los tiempos post-infección.

Efecto de los inhibidores endocíticos sobre la viabilidad de los osteoblastos humanos.

Como se observa en la figuras 5 y 6, las concentraciones utilizadas de los diferentes inhibidores no alteraron la viabilidad celular, en todos los casos se observó una viabilidad del 90 al 100%.

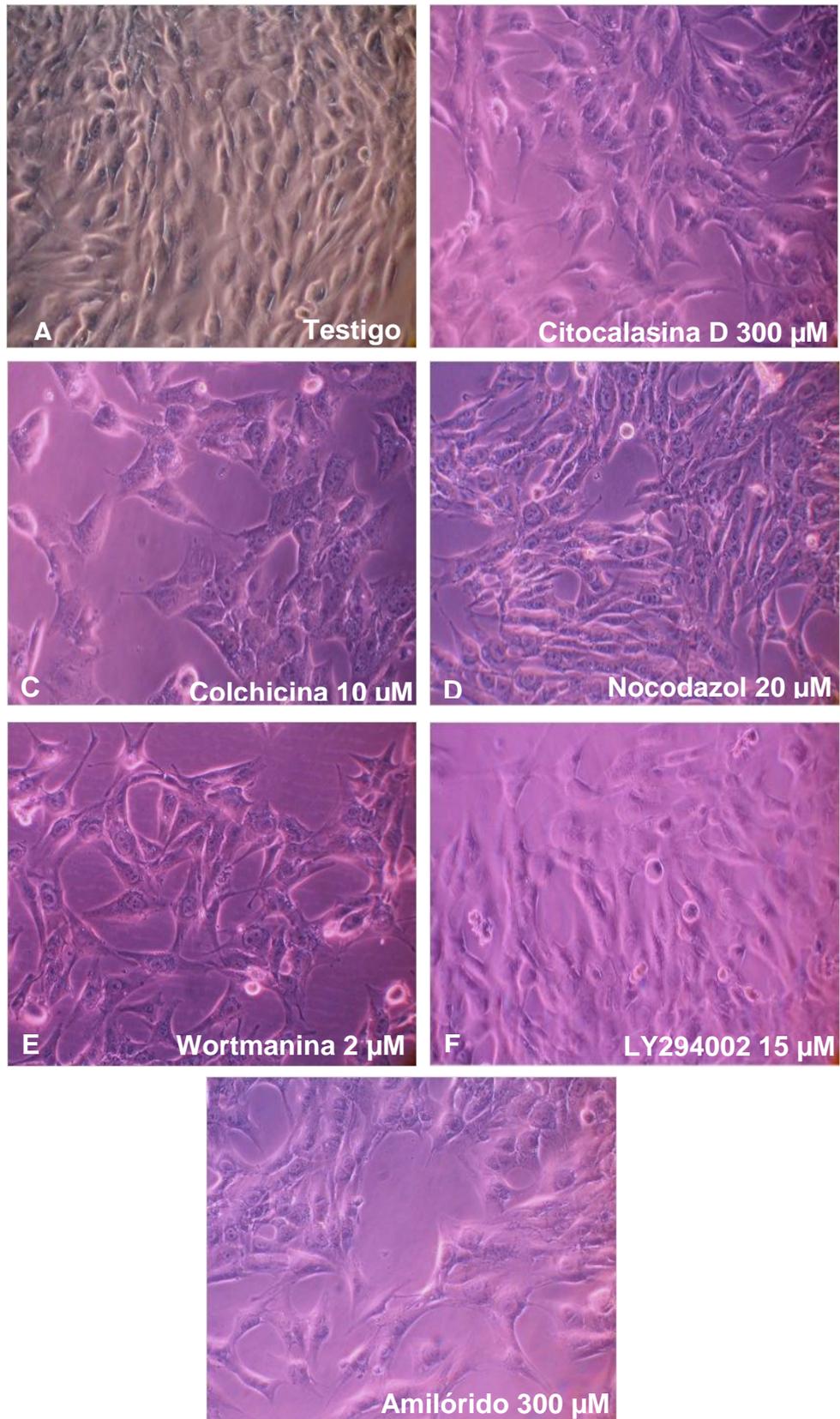


Fig. 5. Efecto de los inhibidores endocíticos sobre la viabilidad de los osteoblastos.

Las imágenes muestran que la mayoría de los osteoblastos son viables después de ser tratados con las concentraciones más altas de los diferentes inhibidores endocíticos. 200X.

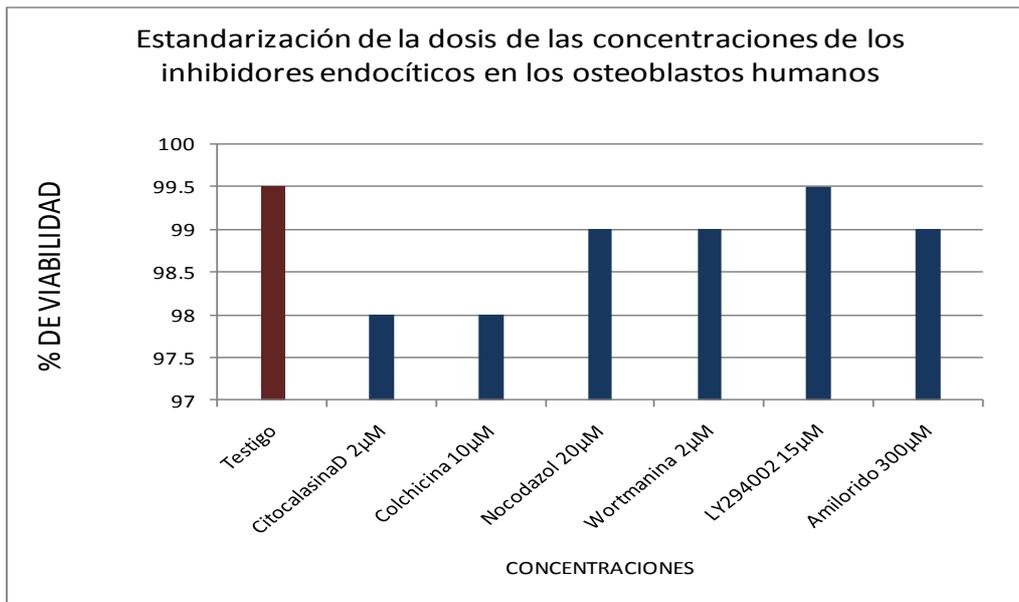


Fig. 6. Porcentaje de viabilidad de los osteoblastos humanos después de la adición de los inhibidores endocíticos.

Como se observa en la gráfica, para todos los inhibidores se observó un elevado porcentaje de viabilidad de los osteoblastos cuando fueron sometidos a los diferentes inhibidores a las dosis más altas empleadas.

Efecto de los inhibidores endocíticos en la interiorización de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos.

Para determinar el efecto de los inhibidores endocíticos sobre la entrada de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos se realizaron ensayos de infección en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores a analizar y se recuperaron las UFC. Los resultados obtenidos demostraron que la citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina, disminuyó la entrada de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos hasta el 63% a la mayor concentración usada (2 µM), siendo este efecto dosis-dependiente (Figura 7).

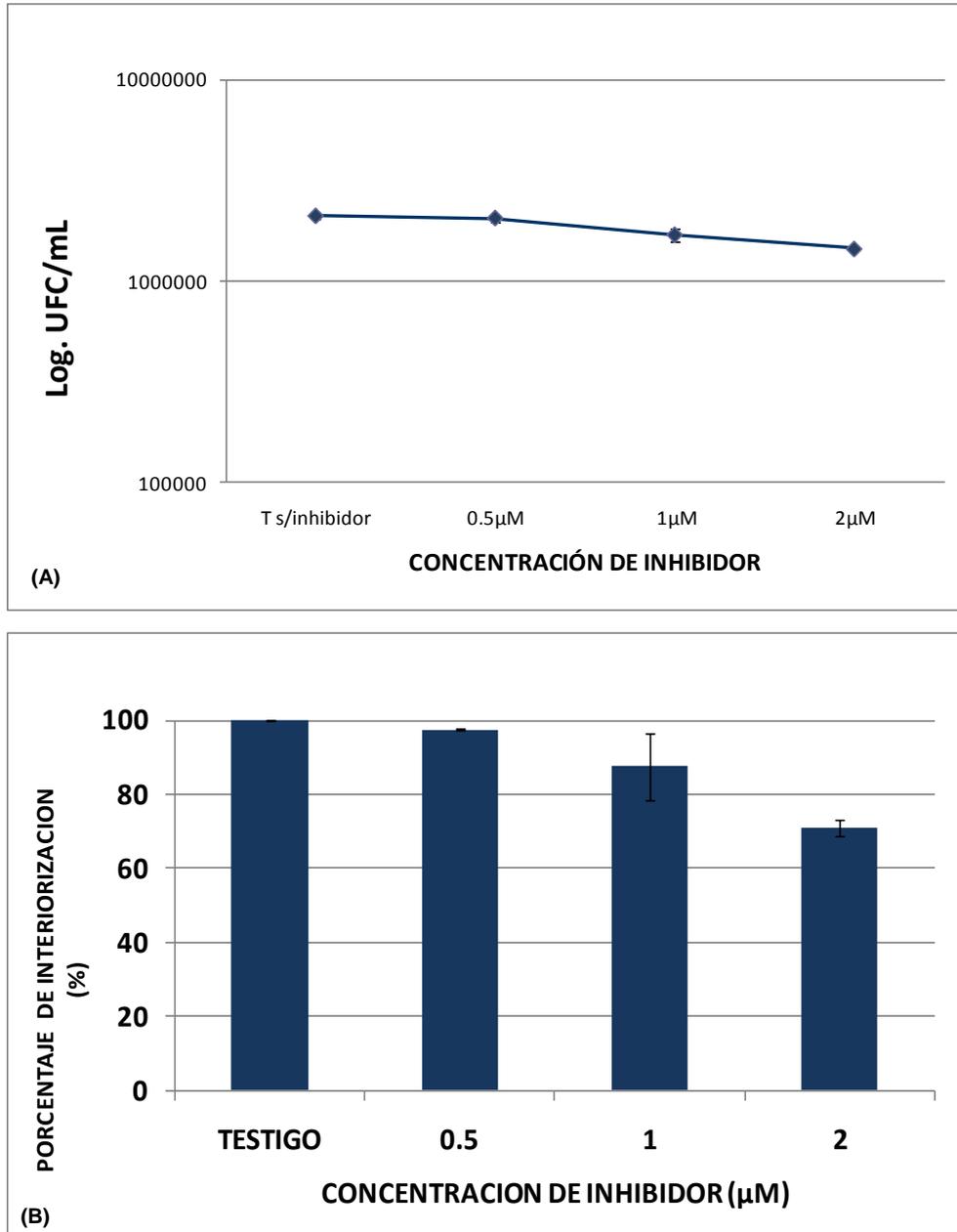


Fig. 7. Efecto inhibitor de la Citocalasina D sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos.

A. UFCs obtenidas después de la adición del inhibidor, en la que se observa una disminución de las UFCs dependiente del aumento en las concentraciones del inhibidor. **B.** Porcentaje de interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos en presencia de citocalasina D, se observa una disminución en el porcentaje de interiorización de la bacteria respecto a la dosis del inhibidor.

Con respecto a los inhibidores de la polimerización de microtúbulos empleados, se observó que el nocodazol mostró mayor efecto que la colchicina. El nocodazol disminuyó el porcentaje de interiorización hasta el 20% con la mayor concentración usada (20 μM), con un efecto dosis-dependiente (Figura 8), mientras que la colchicina disminuyó este porcentaje sólo hasta el 60% con la máxima concentración y con el mismo efecto dosis-dependiente (Figura 9).

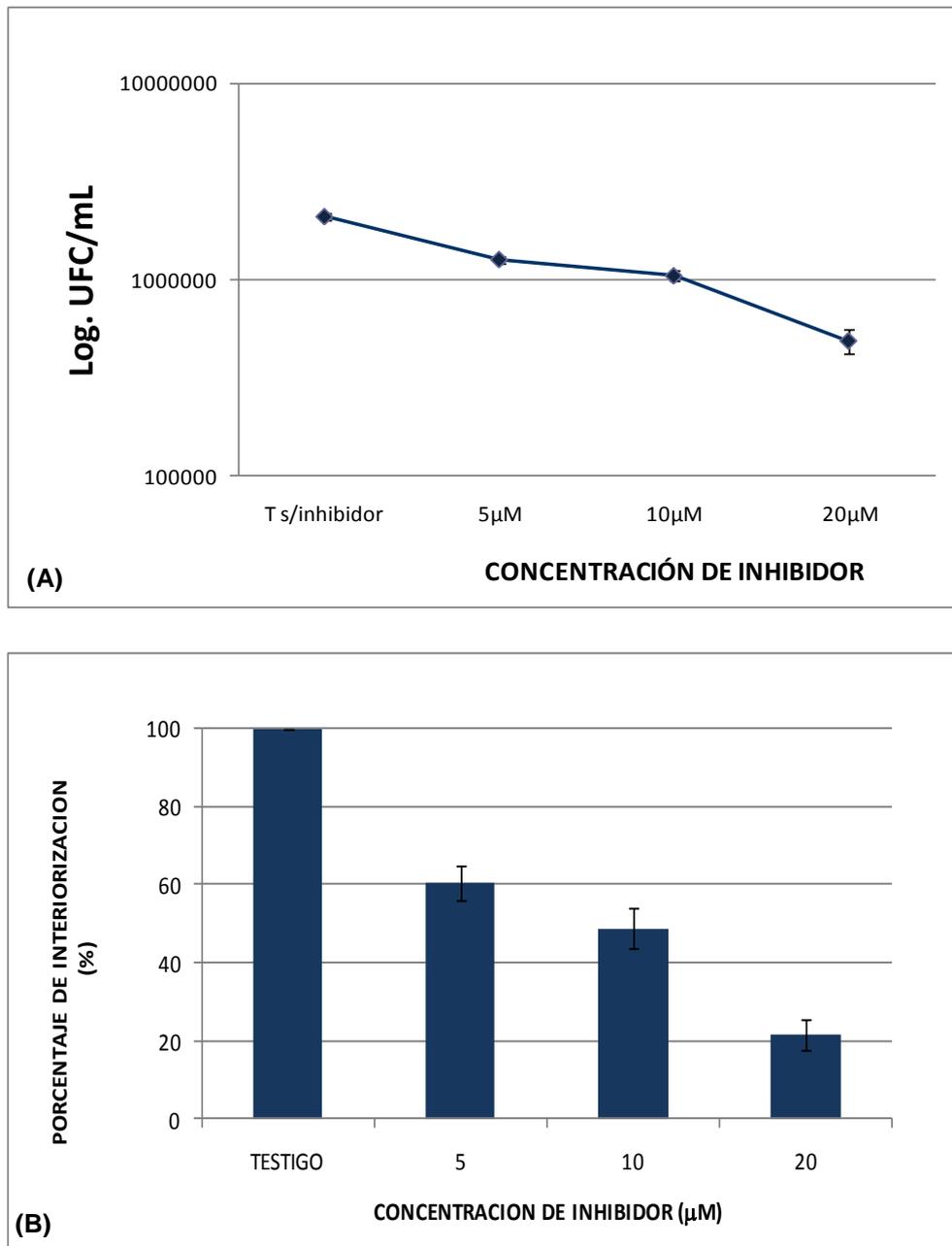


Fig. 8. Efecto inhibitor del Nocodazol sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos.

A. UFC recuperadas después de la adición del inhibidor. **B.** El porcentaje de interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos, fue disminuido hasta un 20% a la mayor concentración del inhibidor (20 μM).

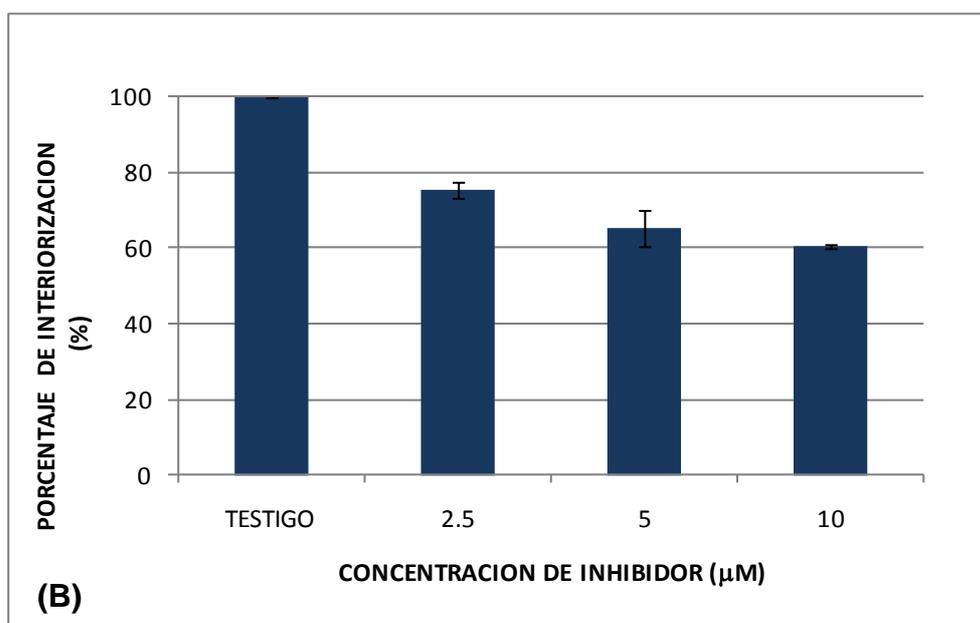
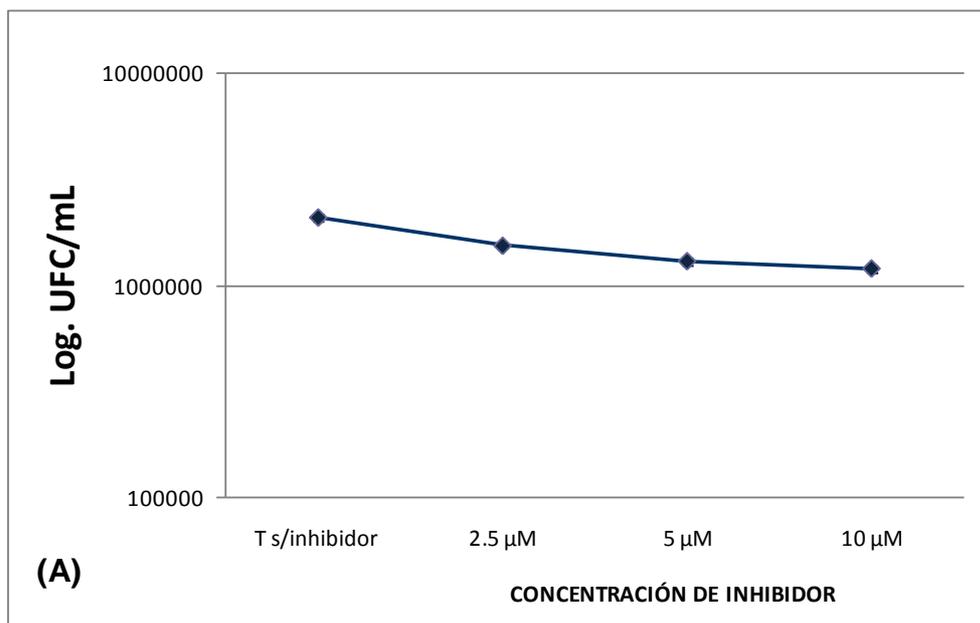


Fig. 9. Efecto inhibitor de la Colchicina sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos.

A. Se observa una clara disminución en las UFCs después de la adición del inhibidor.

B. Porcentaje de interiorización de *P. gingivalis* en los osteoblastos, se observa un porcentaje de interiorización menor (60%) cuando se adiciona la mayor concentración del inhibidor (2μM).

Para evaluar la participación de la fosfatidil-inositol-3-cinasa, sobre la entrada de esta bacteria en los osteoblastos, se realizaron ensayos de infección usando diferentes concentraciones de wortmanina y LY294002. Los resultados obtenidos con los inhibidores de la PI K-3, también tuvieron efectos importantes sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos. La wortmanina redujó la captación de la bacteria por los osteoblastos hasta el 60% con la máxima dosis usada (2 μM) (Fig 10), mientras que el LY294002, mostró un efecto ligeramente mayor, ya que redujó la entrada hasta el 40% con la máxima dosis (15 μM). Ambos inhibidores mostraron un efecto dosis-dependiente con las dos concentraciones más altas (Fig. 11).

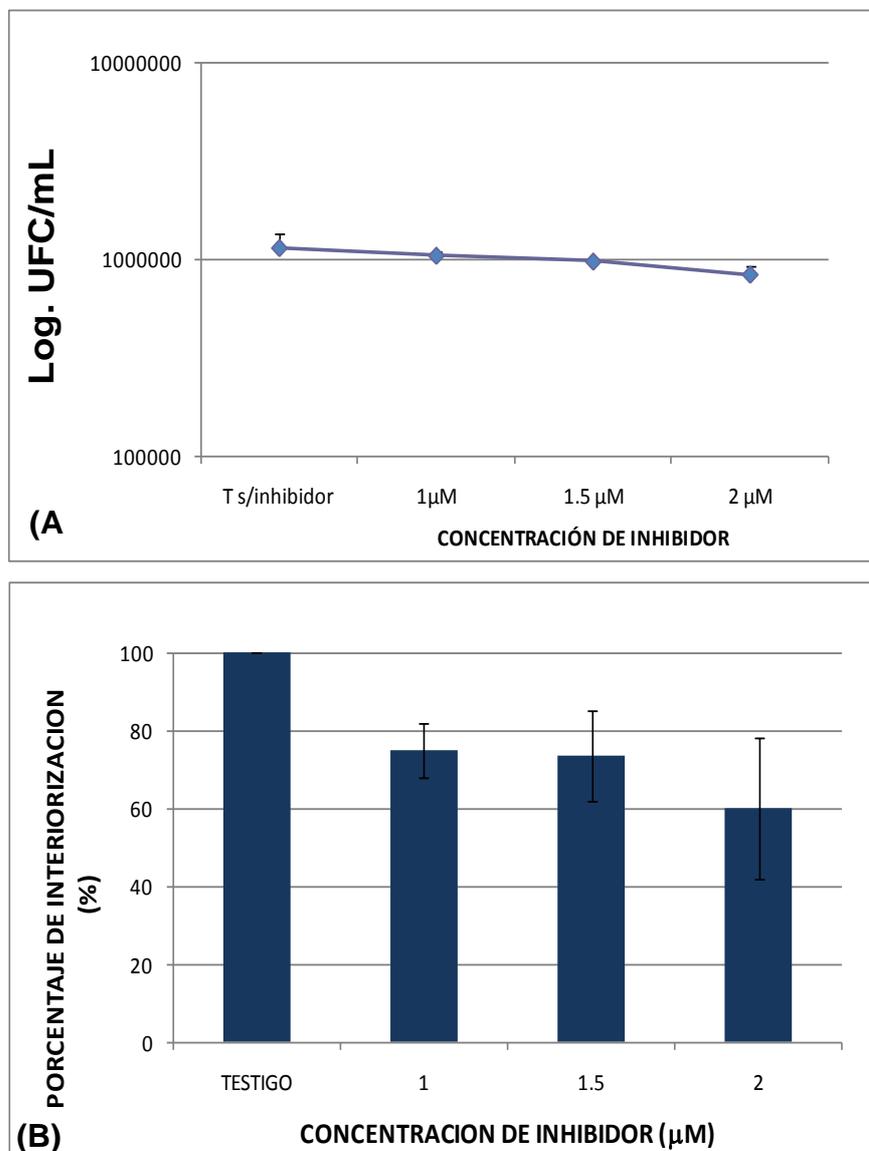


Fig. 10. Efecto inhibitor de la Wortmanina sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos.

A. UFC recuperadas después de la adición del inhibidor. **B.** Porcentaje de interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos en presencia de wortmanina.

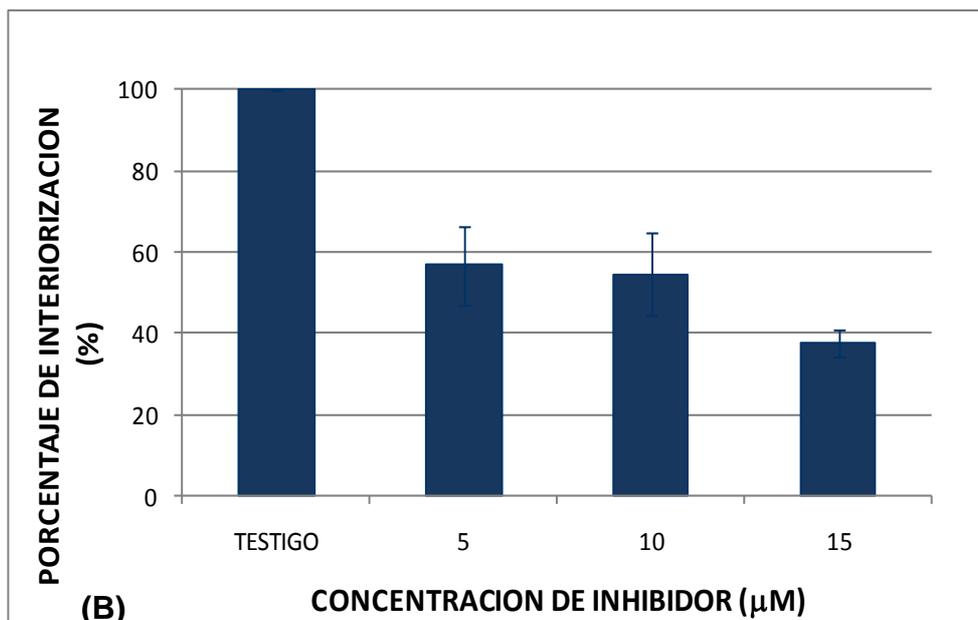
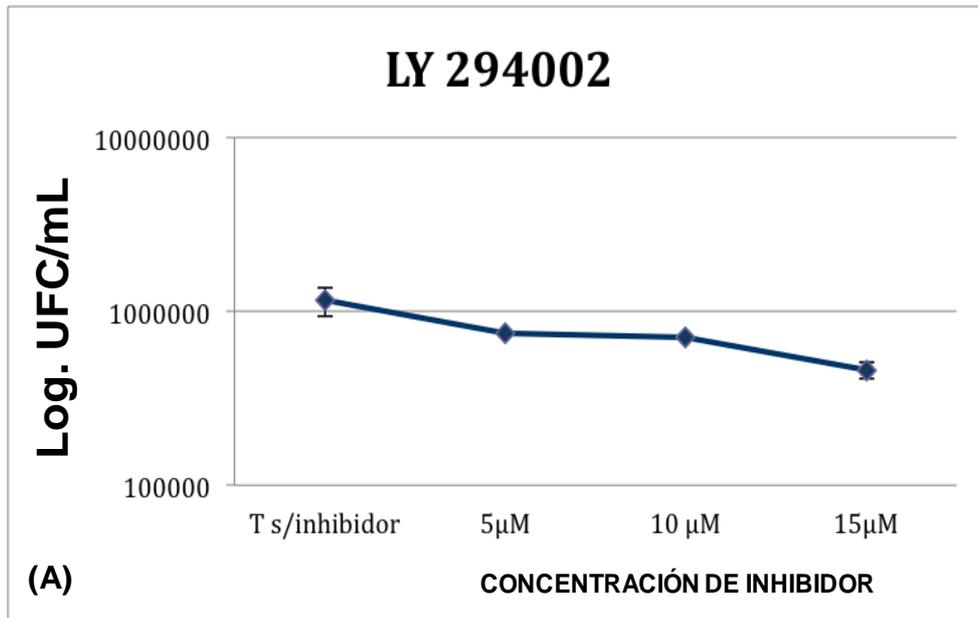


Fig. 11. Efecto inhibitor del LY294002 sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos.

A. Se observa una clara disminución de las UFC al adicionarse el inhibidor a diferentes concentraciones. **B.** La interiorización de *P. gingivalis* pudo inhibirse hasta casi un 40% utilizando la concentración más alta (15 μM) del inhibidor.

Para descartar o confirmar a la macropinocitosis como un posible mecanismo de entrada de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de amilórido. Este inhibidor redujó la interiorización de la bacteria hasta aproximadamente el 40% con las dosis de 100 y 200 μM , con 300 μM sólo se observó una disminución hasta el 70% (Fig. 12).

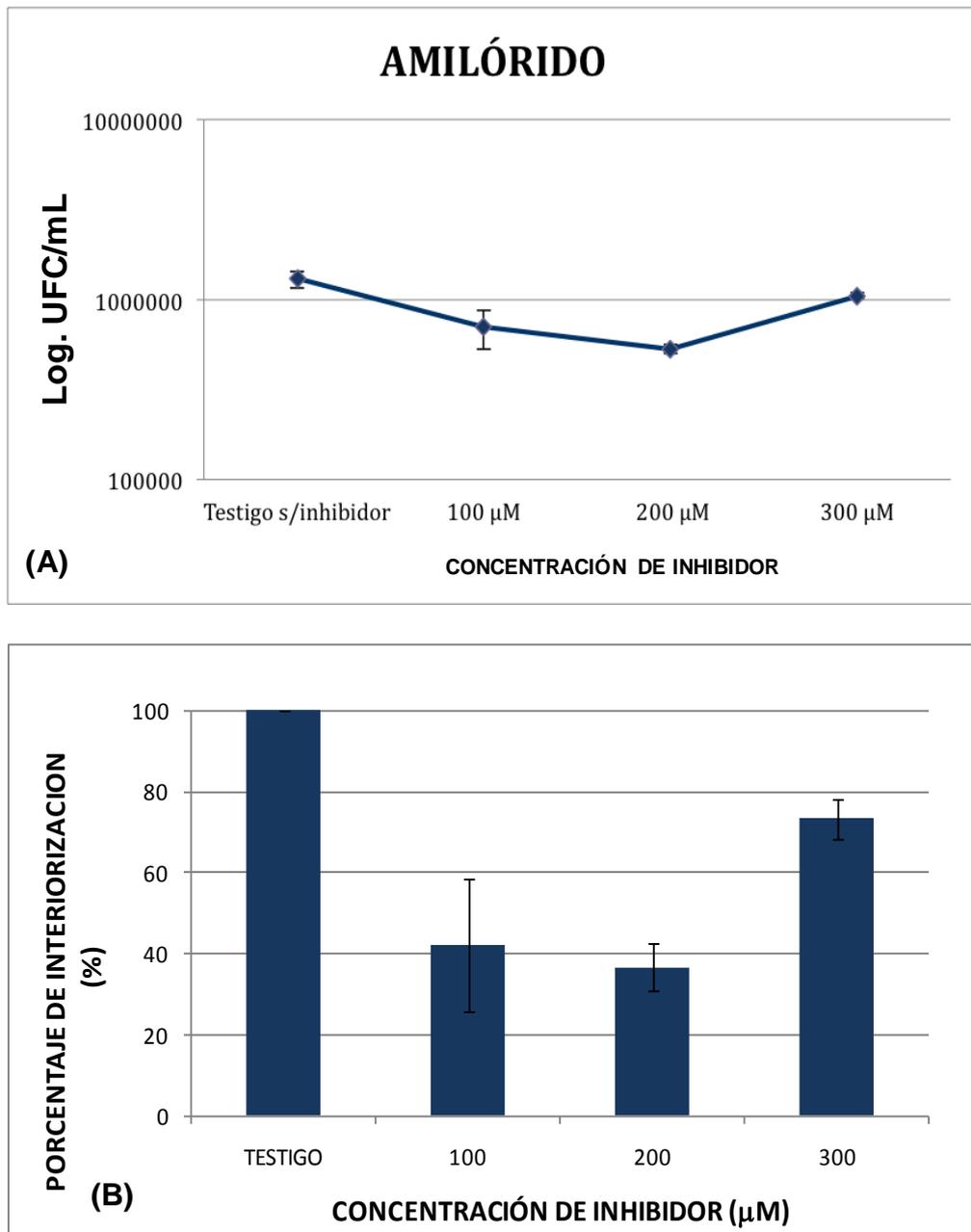


Fig. 12. Efecto inhibitor del Amilórido sobre la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos. A. UFC cuantificadas después del tratamiento con el inhibidor. **B.** El porcentaje de interiorización de *P. gingivalis* ratifica lo observado en las UFCs.

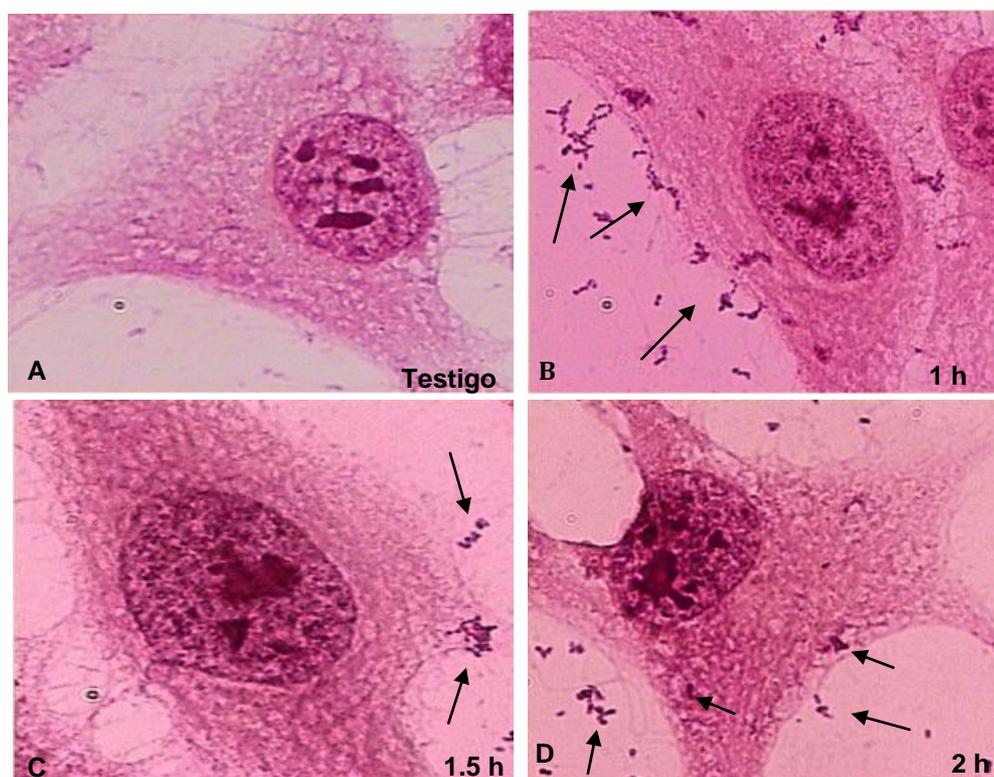
Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición para cada uno de los inhibidores, el cual se resume en la tabla 2. Como puede observarse los mayores porcentajes de inhibición se encontraron cuando se utilizaron las máximas dosis de inhibidor. El nocodazol, el LY294002 y el amilórido fueron los inhibidores que mostraron un porcentaje de inhibición superior al 50% con la máxima dosis empleada, excepto el amilórido. El nocodazol fue el inhibidor que más efecto presentó (78.23%). La citocalasina D fue el inhibidor que menor efecto tuvo, alcanzando apenas el 28.99% de inhibición a la máxima dosis utilizada.

Tabla 2. PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LOS DIFERENTES INHIBIDORES ENDOCÍTICOS		
INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN (μM)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (%)
Citocalasina D	0.5	2.4
	1	12.5
	2	28.9
Colchicina	2.5	24.6
	5	34.8
	10	39.5
Nocodazol	5	39.7
	10	51.1
	20	78.2
Wortmanina	1	25
	1.5	26.5
	2	39.8
LY294002	5	43.3
	10	45.5
	15	62.4
Amilórido	100	57.7
	200	63.3
	300	26.5

Interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

Para determinar la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos se realizó una cinética de infección y post-infección, la cual se procesó para tinción con Hematoxilina y Eosina, en donde los osteoblastos se tiñen de morado y *P. gingivalis* de rosa intenso.

Las fotografías obtenidas en la microscopía óptica revelaron la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos, los osteoblastos sin infectar se observaron con la morfología cuboidal característica de esta estirpe celular. Por el contrario, las células infectadas por *P. gingivalis* mostraron tener cambios morfológicos evidentes entre los que se incluyen diversas proyecciones citoplasmáticas que asemejan a filopodios, estos cambios fueron más evidentes en las áreas en las que se observan los conglomerados bacterianos (teñidos de rosa intenso). En los tiempos tempranos de infección, los bacilos se encontraron en la periferia de la célula y en estrecho contacto con las extensiones citoplasmáticas, en los tiempos tardíos, muchos de los bacilos se visualizaron en el citoplasma celular y en el área perinuclear (Figura 13).



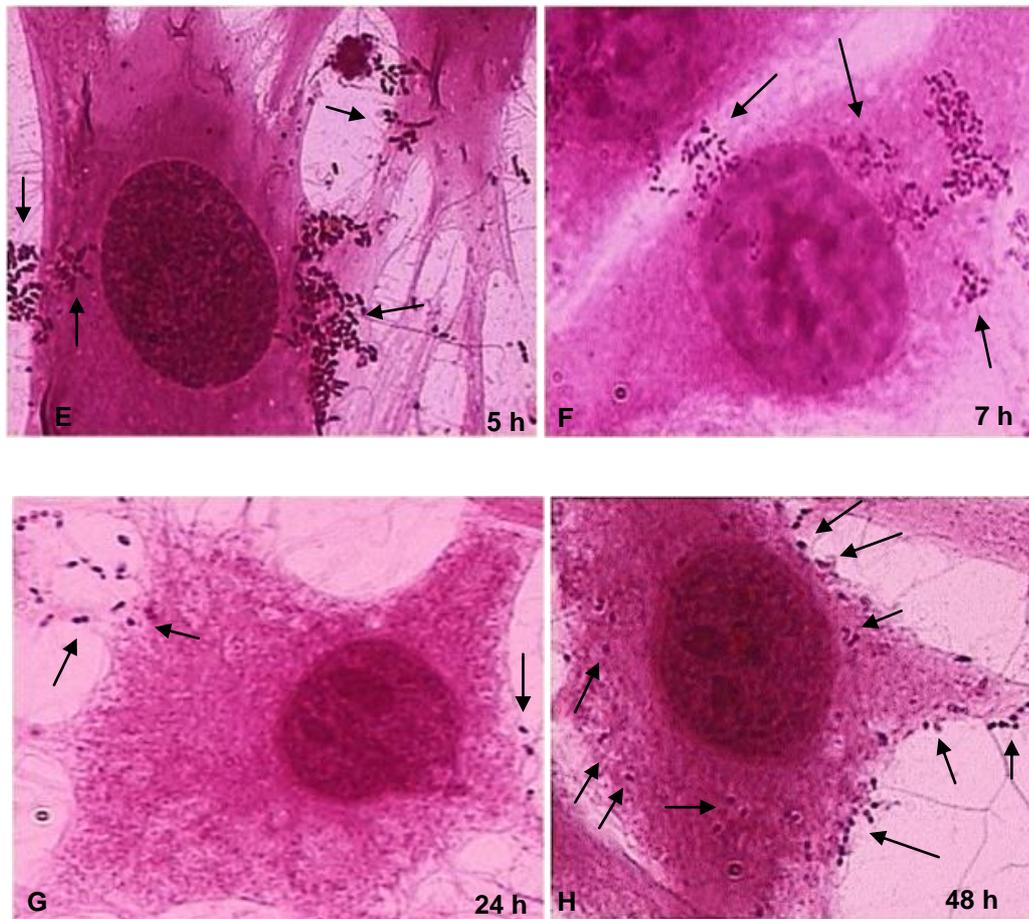
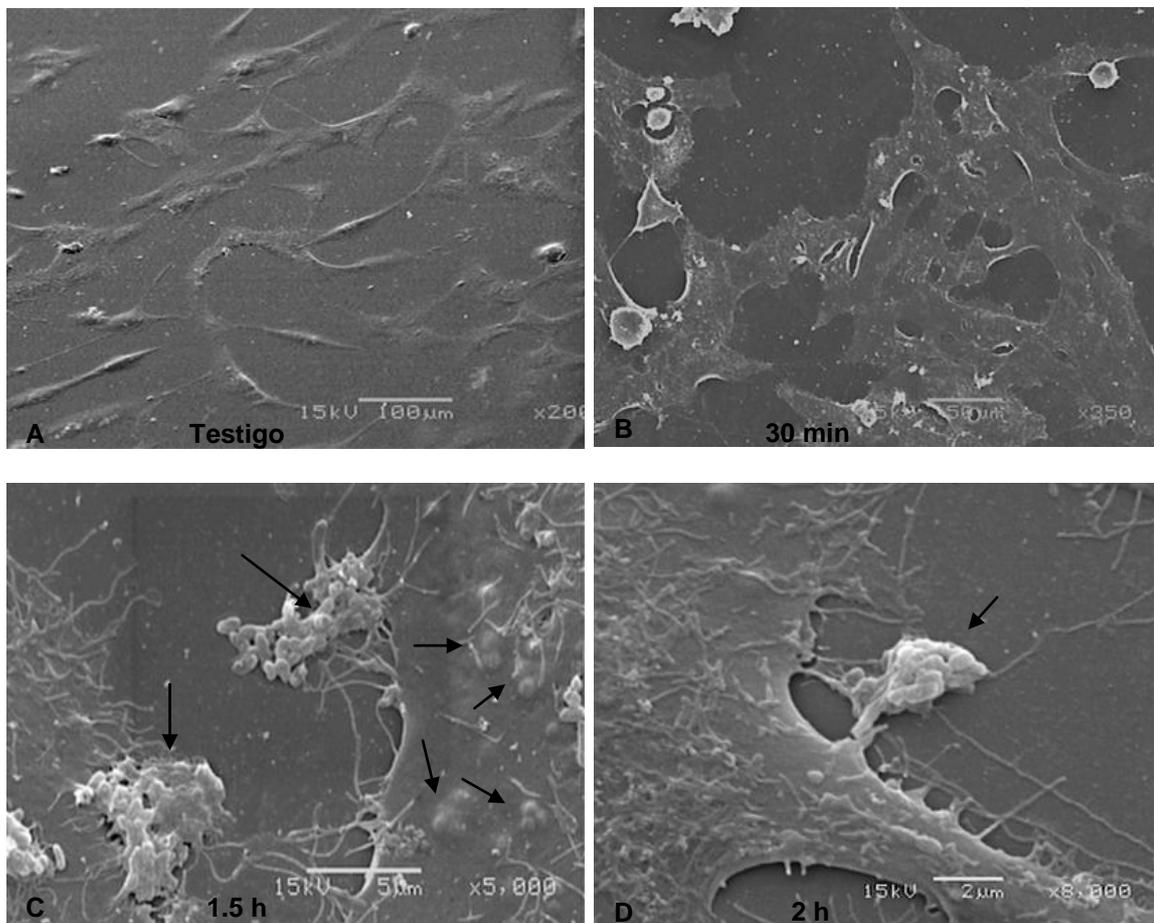


Fig. 13. Interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos. **A.** Osteoblasto sin infectar. **B.** Las flechas señalan los conglomerados bacterianos (teñidos de rosa intenso) alrededor y en el citoplasma celular. **C.** Se observa a los conglomerados bacterianos captados por la membrana citoplasmática de la célula (flechas). **D.** Es evidente el cambio estructural del osteoblasto adquiriendo una morfología semejante a una estrella, pueden observarse algunas bacterias en el área citoplasmática, las flechas también señalan las bacterias captadas por la membrana de la célula. **E.** Nótese los impresionantes cambios citoplasmáticos en la célula y la formación de pequeñas extensiones citoplasmáticas semejantes a filopodios que hacen contacto con las bacterias, incluso algunas proyecciones citoplasmáticas hacen contacto con su célula vecina, las flechas señalan como las bacterias se adhieren de forma localizada alrededor de la membrana celular y cerca del núcleo. **F.** Las flechas señalan a los múltiples grupos de bacterias se en el área intercelular, perinuclear y citoplasmática. **G.** Continúan observándose cambios extraordinarios en la periferia de la membrana celular, las flechas señalan las áreas en las que parece ser captada *P. gingivalis*. **H.** Muchas de las bacterias son captadas y las flechas también señalan algunas bacterias que se observan en el citoplasma celular y próximas al núcleo (Aumento: 1000X).

Determinación ultraestructural de la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

Para determinar los cambios citoplasmáticos que se producen a nivel ultraestructural durante la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos, se realizó microscopía electrónica de barrido.

Las células sin infectar se observaron con escasas proyecciones citoplasmáticas, de morfología cuboidal y con una superficie homogénea. En las células infectadas los cambios morfológicos ultraestructurales son aparentes desde los 30 min de infección, se observaron estructuras semejantes a los lamelipodios en la cara apical de las células. En los tiempos de 1.5 y 2 h de infección se observaron abundantes estructuras citoplasmáticas que atraparon a los bacilos presentes en la superficie celular. En el último tiempo de la cinética (7 h), aunque no se observaron bacilos en la superficie de la monocapa, las células se observaron con un citoplasma muy vacuolado y con un aparente aumento en el volumen celular (Figura 14).



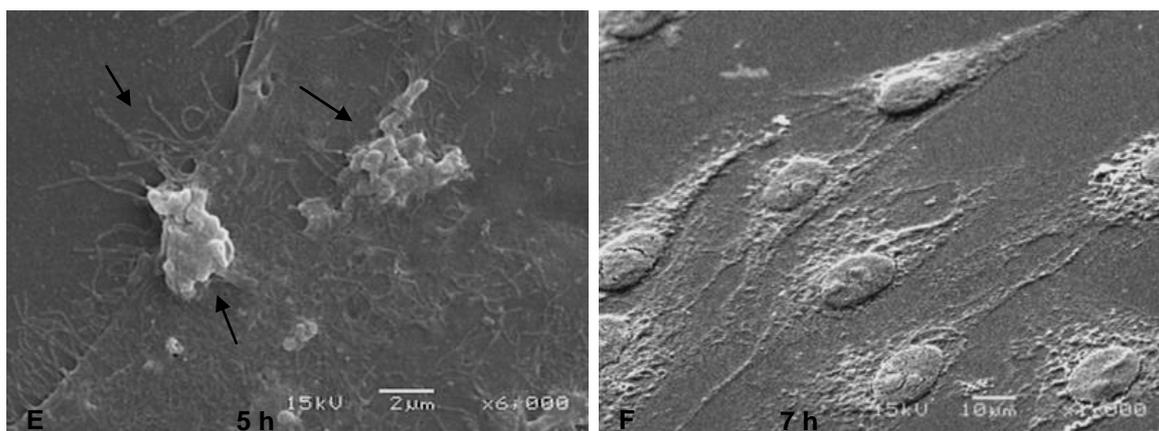
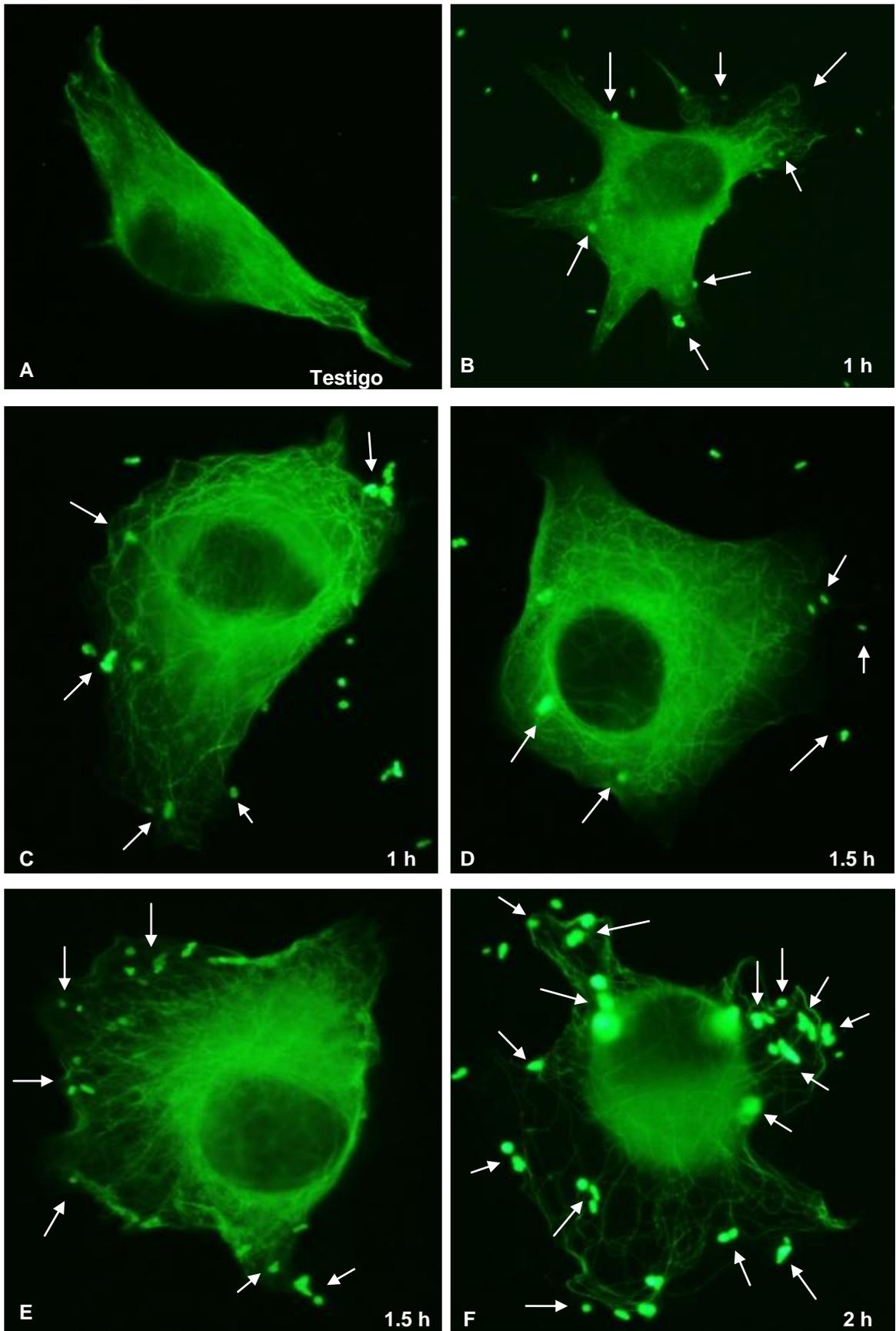


Fig. 14. Micrografías electrónicas de la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

A. Osteoblastos sin infectar. **B.** Los cambios morfológicos celulares son evidentes a partir de este tiempo. **C.** Las flechas señalan a *P. gingivalis* captada por dos células vecinas, se observan múltiples filopodios capturando a la bacteria. Las flechas también indican diferentes áreas en las que se presentan “abultaciones” en la superficie de la membrana de la célula derecha. **D.** Diversas proyecciones citoplasmáticas dirigidas al conglomerado bacteriano (flecha), observense los múltiples filopodios en la superficie y en la periferia del citoplasma celular. **E.** Las flechas señalan los diferentes conglomerados formados por *P. gingivalis* en la superficie de la membrana celular, también se señalan los múltiples filopodios en la periferia celular. **F.** Se observa cierta disrupción de la monocapa celular.

Participación de los microtúbulos en la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

Para evidenciar la participación de los microtúbulos durante la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, usando un anticuerpo anti-tubulina. Las células sin infectar mostraron una distribución homogénea de los microtúbulos en todo el citoplasma celular, no se observaron prolongaciones citoplasmáticas y las células mantuvieron su arquitectura y su morfología celular característica. Comparativamente, cuando las células se infectaron, se observaron evidentes cambios morfológicos, se perdió la distribución homogénea de los microtúbulos y estos aparentemente fueron el sostén de las numerosas proyecciones citoplasmáticas que se observaron en contacto con los bacilos, también fue evidente la estrecha asociación de los microtúbulos con las bacterias y la presencia de éstas en el citoplasma y en la región perinuclear de la célula. (Fig. 15).



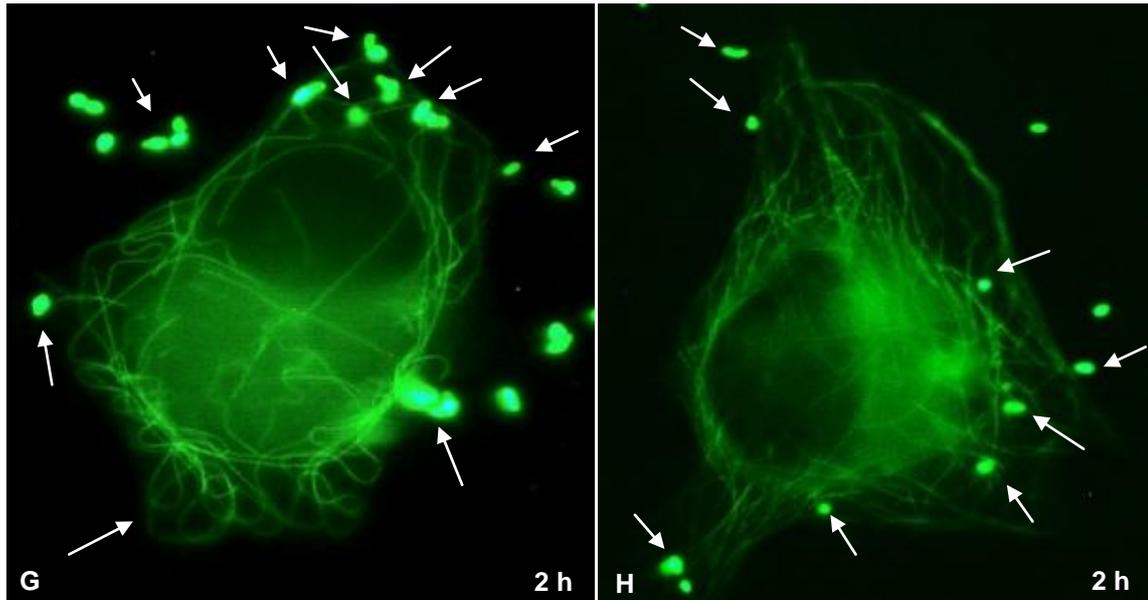
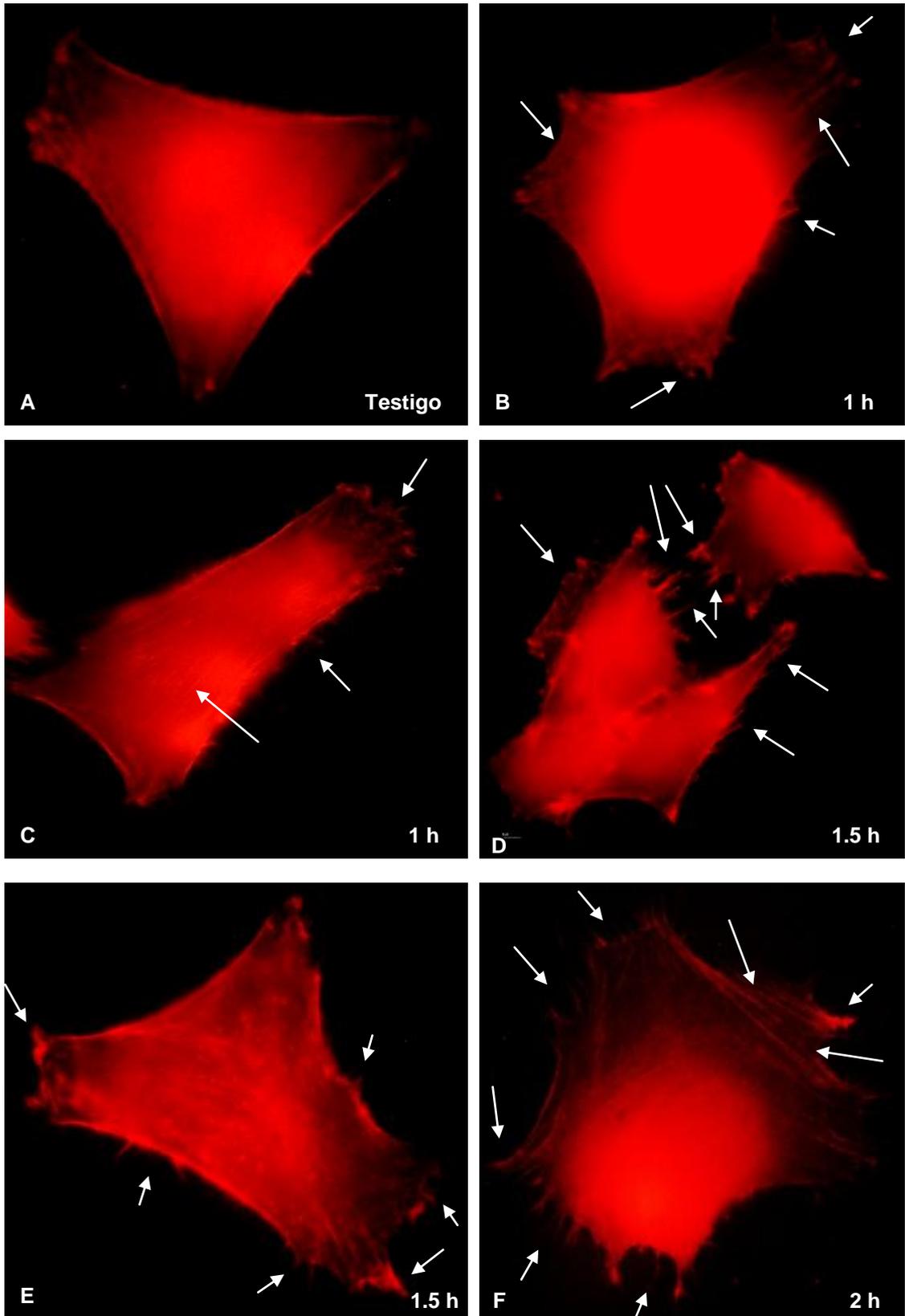


Fig. 15. Imágenes de la interacción de *P. gingivalis* con los microtúbulos de los osteoblastos.

A. Osteoblasto sin infectar. **B y C,** Obsérvese el cambio en la morfología celular y en los microtúbulos, los microtúbulos contactan con *P. gingivalis* (flechas). **D y E.** Los microtúbulos del citoplasma se extienden de una manera que asemejan una sábana, las flechas señalan su interacción con *P. gingivalis*. **F, G y H.** Continúa el extraordinario rearrreglo de los microtúbulos, las flechas señalan a *P. gingivalis* en contacto con los microtúbulos y algunas de las bacterias pueden observarse cerca del núcleo. Aumento: 1000X.

Participación de los filamentos de actina en la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos.

Para evidenciar el papel de los filamentos de actina durante la infección de los osteoblastos humanos por *P. gingivalis*, se tiñeron los filamentos de actina con faloidina rodaminada. Los resultados obtenidos evidenciaron en las células sin infectar una distribución longitudinal y homogénea de los filamentos de actina, la membrana celular no presentó prolongaciones citoplasmáticas evidentes, por lo que la periferia se observó bien delimitada. Las células infectadas mostraron cambios morfológicos importantes, los cuales fueron más evidentes a las 2 h de infección. La infección celular indujo abundantes prolongaciones citoplasmáticas semejantes a filopodios pequeños con puntos focales de adhesión en los extremos, se observó también pérdida de la morfología cuboidal y redistribución de los filamentos de actina (Figura 16).



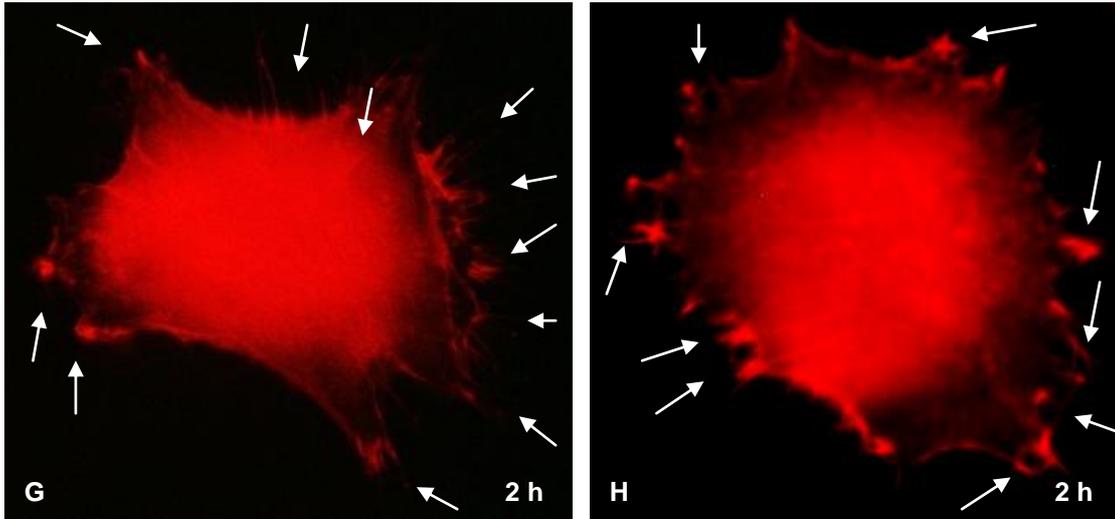


Fig. 16. Imágenes de la interacción de *P. gingivalis* con los filamentos de actina de los osteoblastos humanos. **A.** Osteoblasto sin infectar. **B y C,** Obsérvese que los osteoblastos emiten filopodios y una morfología alargada en comparación a la célula sin infectar (flechas). **D y E.** Son evidentes las pequeñas prolongaciones citoplasmáticas en los extremos de la membrana de las células, las flechas señalan dichas prolongaciones. **F, G y H.** Las células se observan menos alargadas, sin embargo continúan proyectándose múltiples filopodios en los extremos de la membrana celular (flechas). Aumento: 1000X.

DISCUSIÓN.

Como se sabe, la cavidad oral esta expuesta a numerosos microorganismos sin que ello necesariamente implique el desarrollo de una patología (Kumagai et al., 2005; Ruby et al., 2002). Existen factores locales y sistémicos que pueden alterar la homeostasis del microambiente oral, estos factores pueden actuar sobre la expresión de citocinas y osteocinas locales, factores de crecimiento, factores genéticos, hormonas y hábitos alimenticios (Yoshie et al., 2007; Garant et al., 2003; Lamont et al., 1998). Las alteraciones en estos factores pueden favorecer que algunos microorganismos de la cavidad oral, que residen como comensales, puedan participar en eventos patológicos, tal es el caso de la bacteria anaerobia *P. gingivalis* (Cuttler et al., 2007). Esta bacteria y sus factores de virulencia como el LPS, la fimbria principal y las proteinasas, estan relacionados de manera importante con el disparo de la respuesta inmune y con el desarrollo de la enfermedad periodontal ó periodontitis (Yilmaz et al., 2008; Andrian et al., 2006; Lamont et al., 2002; Lamont et al., 2000; Lamont et al., 1998). La periodontitis es una patología que se caracteriza por inflamación excesiva de la encía y destrucción de los tejidos periodontales, que incluyen al hueso alveolar, en casos severos la periodontitis conduce a la movilidad y pérdida de los dientes (Mahanonda et al., 2007; Ruby et al., 2002; Graber et al., 2000).

Son diversas las células que constituyen al tejido periodontal, las células epiteliales, forman una barrera protectora ante los microorganismos orales y son las primeras células que interactúan con dichos microorganismos. Los fibroblastos brindan la estructura y conforman el tejido conectivo periodontal sintetizando a la colágena y otras proteínas de la matriz extracelular, los osteoblastos son las células óseas encargadas de la síntesis de matriz ósea (Riancho et al., 2003). El hueso alveolar es el tipo de hueso que constituye los maxilares, es remodelado constantemente de acuerdo a las demandas funcionales y aloja a los dientes (Topazian et al., 2002).

P. gingivalis es una bacteria anaerobia estricta relacionada con la inducción de la enfermedad periodontal. Estudios previos han demostrado la interacción de *P. gingivalis* y sus factores de virulencia con las células epiteliales (Ling et al., 2008; Yilmaz et al., 2008; Andrian et al., 2006; Lamont et al., 1998), endoteliales (Ling et al., 2008; Zahlten et al., 2007; Okahashi et al., 2004; Wang et al., 2002) y fibroblastos, (Brunner et al., 2010; Roberts et al., 2008; Sun et al., 2008; Kiji et al., 2007; Mahanonda et al., 2007; Urnowey et al., 2006) sin embargo poco se sabe de la interacción de esta bacteria con los osteoblastos humanos. En este trabajo decidimos estudiar la interacción entre *P. gingivalis* 33277 y los osteoblastos humanos MG-63 ya que durante el desarrollo de la enfermedad periodontal, se presenta una intensa resorción ósea alveolar. Diversos estudios han demostrado la interacción de *P. gingivalis* con diversas células eucariotas. Los trabajos de Lamont et al., 1995, fueron unos de los primeros en evidenciar la interacción y la invasión de *P. gingivalis* 33277 en las células epiteliales gingivales *in vitro*. En estos estudios se demostró que la bacteria interactúa con las células epiteliales gingivales en tiempos tempranos de la infección y que *P. gingivalis* es capaz de invadir y replicarse en el interior de estas células. Nuestros resultados demostraron que *P. gingivalis* 33277 también es capaz de interactuar con los osteoblastos humanos MG-63 a tiempos tempranos de infección y que a partir de las 2 h de infección disminuyen las UFCs, esta tendencia continua hasta las 24 h de infección, tiempo en el que no pudimos cuantificar UFCs. Esto sugiere que aunque *P. gingivalis* es interiorizada por estas células, la bacteria es eliminada durante las primeras 24 h. Otros estudios con células epiteliales y endoteliales evidenciaron que *P. gingivalis* es eliminada intracelularmente durante las primeras 24 h de infección, tiempo en cuantificaron pocas UFCs, a las 48 h de infección no recuperaron UFCs (Ling et al., 2008; Madianos et al., 1996). Probablemente *P. gingivalis* sea eliminada por los mecanismos de defensa intracelulares de las células infectadas, los cuales aún deben ser establecidos, sin embargo la variabilidad de la afinidad de la bacteria hacia determinados tipos celulares no se descarta como otra posible explicación de este fenómeno (Ling et al., 2008).

No descartamos que los antibióticos utilizados durante las cinéticas de infección, para la eliminación de las bacterias extracelulares, posiblemente puedan atravesar la membrana celular de las células, lo que favorecería la eliminación de las bacterias intracelulares sin la intervención de mecanismos intracelulares de defensa.

Otra posible explicación es la exposición de la bacteria a un ambiente aerobio durante las cinéticas de infección, lo que podría afectar su capacidad para interactuar y ser captada por las células eucariotas (Madianos et al., 1996).

Para determinar la participación de las proteínas del citoesqueleto durante la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos, utilizamos diferentes inhibidores endocíticos, demostrando la participación de los filamentos de actina y los microtúbulos en la interiorización de la bacteria. La adición de Citocalasina D, (inhibidor de los filamentos de actina), a la mayor dosis (2 μ M), pudo inhibir hasta en un 30% la interiorización de la bacteria en los osteoblastos, a diferencia de lo reportado por Rajashri et al., 1998 y Lamont et al., 1995, quienes observaron un porcentaje de inhibición del 97.5% en las células endoteliales y un 93% en las células epiteliales gingivales infectadas con *P. gingivalis* 33277.

Utilizando inhibidores de los microtúbulos como la colchicina (10 μ M) y el nocodazol (20 μ M), observamos un porcentaje de inhibición del 40 y 80% respectivamente, la wortmanina (2 μ M) y el LY 294002 (15 μ M), inhibidores de la PI-3K, impidieron la entrada de la bacteria en un 40 y 62% respectivamente también a mayores dosis, finalmente, el amilórido (inhibidor de la macropinocitosis) a medianas dosis (200 μ M) alcanzó su mayor efecto inhibitorio (63.3%) en la interiorización de la bacteria. Así, nuestros resultados sugieren que los filamentos de actina y principalmente los microtúbulos participan de manera importante en la captación e interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos. Otros autores, han demostrado previamente la participación de los filamentos de actina y los microtúbulos utilizando inhibidores endocíticos de proteínas del citoesqueleto en otras células eucariotas (Yilmaz et al., 2003; Dorn et al., 2001; Dorn et al., 1999; Rajashri et al., 1998; Lamot et al., 1995).

El alto porcentaje inhibitor (63.3%) del amilórido en la interiorización de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos, sugiere a la macropinocitosis como una de las vías endocíticas involucradas en la captación de la bacteria durante la infección, aunque otras vías endocíticas no deben descartarse.

Para determinar la interacción de *P. gingivalis* con los osteoblastos humanos, se realizaron diferentes técnicas microscópicas. Los rearrreglos del citoesqueleto fueron evidentes durante la infección de los osteoblastos con la bacteria, los cambios morfológicos en el citoplasma y membrana celular lo evidenciaron. Sin embargo no descartamos la posible participación de otras proteínas del citoesqueleto, como los filamentos intermedios, en la interacción entre *P. gingivalis* y los osteoblastos humanos.

La microscopía óptica, evidenció desde tiempos tempranos (1 h de infección) una rápida y numerosa interacción de la bacteria con los osteoblastos humanos, los cuales presentaron cambios morfológicos evidentes en su citoplasma, una vez infectados, los osteoblastos desarrollaron prolongaciones citoplasmáticas que contactaban con los conglomerados bacterianos, este fenómeno fué constante hasta las 24 h de infección. Las microscopías electrónica de barrido (SEM), corroboraron lo observado bajo la microscopía óptica. Durante la realización de la SEM se siguió una cinética de infección de 30 minutos, 1, 1.5, 2, 5 y 7 h.

La formación de filopodios en los extremos membranales de las células infectadas fueron evidentes, múltiples extensiones citoplasmáticas contactaban a los conglomerados bacterianos, también pudimos observar múltiples “abultamientos” en las superficies de algunas células infectadas a los 90 minutos, probablemente producidas por bacterias previamente interiorizadas. Nuestros resultados coinciden con los de Dorn et al., 1999 y Rajashri et al., 1998 en células endoteliales infectadas a tiempos tempranos con *P. gingivalis* 381 y A7436 respectivamente, Phobeus et al., 1996, quienes también evidenciaron cambios morfológicos similares en las células epiteliales gingivales infectadas con *P. gingivalis* 381 aunque estos cambios fueron observados durante tiempos más prolongados (24 h y 3 días de infección).

La microscopía de fluorescencia evidenció un importante rearrreglo de proteínas del citoesqueleto como los filamentos de actina y los microtúbulos durante la infección de los osteoblastos con *P. gingivalis* durante 1, 1.5 y 2 h de infección.

Parece ser que el rearrreglo de los microtúbulos es indispensable, pudimos apreciar extraordinarios cambios morfológicos y evidenciar su interacción con los conglomerados bacterianos y bacterias aisladas. Los microtúbulos formaron múltiples prolongaciones y redes que parecen atrapar a las bacterias, además múltiples bacterias pudieron ser observadas en el área citoplasmática y perinuclear, probablemente ya interiorizadas, estos resultados sugieren un importante papel de los microtúbulos para facilitar no solo la interiorización de la bacteria, sino para que ésta pueda llegar hasta el área perinuclear celular, posiblemente sirviendo de sostén y transporte. Esto coincide con nuestros resultados obtenidos bajo la adición de los inhibidores endocíticos. De manera similar a lo observado por la técnica de microscopía de fluorescencia en el estudio de Yilmaz et al., 2003 en el que infectaron a células epiteliales gingivales con *P. gingivalis* 33277, nosotros también evidenciamos una clara participación de los filamentos de actina durante la infección de los osteoblastos humanos con *P. gingivalis* 33277. Los cambios en el rearrreglo de los filamentos de actina fueron evidentes desde la primera hora de infección, tiempo en el que los osteoblastos parecieron adoptar una conformación alargada, a las 2 h de infección la morfología celular parecía regresar a la inicial, (semejante a la de las células sin infectar), con un citoplasma menos alargado pero con múltiples filopodios en la periferia celular, la mayoría de las bacterias fueron observadas en la periferia de la membrana celular, captadas por los filopodios, sin embargo también pudimos apreciar bacterias en el área citoplasmática de manera similar a lo observado durante tinción de los microtúbulos.

En este trabajo demostramos que *P. gingivalis* puede interactuar e invadir a los osteoblastos humanos y que en este proceso están involucradas proteínas del citoesqueleto, principalmente los microtúbulos y los filamentos de actina, en los cuales se induce una importante reorganización sin que esto altere la viabilidad celular.

Así, los osteoblastos son capaces de interiorizar a *P. gingivalis* y eliminarla en un lapso de 24 h. No obstante, serán necesarios futuros estudios que ayuden a determinar la participación de otras proteínas del citoesqueleto que pudieran estar involucradas en la captación e interiorización de la bacteria.

Actualmente no se descarta la posibilidad de que la interiorización de *P. gingivalis* en los osteoblastos humanos pueda ser facilitada por receptores celulares (aún sin caracterizar) por lo que la búsqueda y caracterización de los mismos puede ser una alternativa en este campo de investigación.

CONCLUSIONES.

- *P. gingivalis* es interiorizada por los osteoblastos humanos y es eliminada a las 24 h.
- La interiorización de *P. gingivalis* en los osteoblastos humanos, depende de la participación de proteínas del citoesqueleto, específicamente de los microtúbulos y de los filamentos de actina sin descartar la participación de los filamentos intermedios u otras proteínas del citoesqueleto.
- La inhibición de la entrada de *P. gingivalis* a los osteoblastos humanos por la Wortmanina y el LY294002 sugiere la participación de la fosfatidil-inósitol-3-cinasa en este proceso.
- La participación de proteínas del citoesqueleto y la inhibición de la entrada por el amilorido sugieren a la macropinocitosis como una de las vías endocíticas responsables de la captación de *P. gingivalis* por los osteoblastos humanos, aunque no se excluyen otras vías endocíticas.

BIBLIOGRAFÍA.

- Andrian, E., Grenier, D., Rouabhia, M., 2006. *Porphyromonas gingivalis*-Epithelial Cell Interactions in Periodontitis. J Dent Res. 85, 392-403.
- Benjamini, E., Coico, R., 2000. Immunology. Fourth edition, Wiley-Liss; 229-238.
- Brunner, J., Scheres, N., El Idrissi, N.B., Deng, D.M., Laine, M.L., Van Winkelhoff, A.J., Crielaard, W., 2010. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. BMC Microbiol. 10, 1-11.
- Choi, E-Y., Hwang, Y-M., Lee, J-Y., 2007. Lipid A-associated proteins from *Porphyromonas gingivalis* stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. J Periodontal Res. 42, 350-360.
- Cuttler, C.W., Teng, Y-T., 2007. Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: many sides of the same coin with new twists. Periodontol 2000. 45, 35-50.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., Fox, P., 2001. *Porphyromonas gingivalis* Traffics to Autophagosomes in Human Coronary Artery Endothelial Cells. Infect Immun. 69, 5698-5708.
- Dorn B.R, Dunn W.A., Fox, P., 1999. Invasion of Human Coronary Artery Cells by Periodontal Pathogens. Infect Immun. 67, 5792-5798.
- Dofferhoff, A.S., Vellenga, E., Liburg, P.C., van Zanten, A., Mulder, P.O., Weits, J., 1991. Tumour necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock: a review of the literature. Neth J Med. 39: 45-62.
- Frolov, I., Houry-Hadad, Y., 1998. In vivo exposure to *Porphyromonas gingivalis* up-regulates nitric oxide but suppresses tumor necrosis factor- α production by cultured macrophages. Immunology. 93, 323-328.
- Furuta, N., Takeuchi, H., Amano, A., 2009. Entry of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles into Epithelial Cells Causes Functional Impairment. Infect Immun. 77, 4761-4470.
- Garant, P.R., 2003. Oral Cells and Tissues. 3ra ed. Quintessence books; 195-227.
- Geneser, F., 2001. Histología, Madrid España 3ra ed. Médica Panamericana; 268-91.
- Giannopoulou, C., Krauz, K-H., Frauke, M., 2008. The NADPH oxidase NOX2 plays a role in periodontal pathologies. Semin Immunopathol. 30, 273-278.
- Graber, T.M., 2000. Current Principles and Techniques. 3ª ed. Elsevier Mosby; 120-129.

Graves, D.T., Oskoui, M., Volejnikova, S., Naguib, G., Cai, S., Desta, Y., Kakouras, A., Jiang, Y., 2001. Tumor Necrosis Factor Modulates Fibroblast Apoptosis, PMN recruitment, and Osteoclast Formation in Response to *P. gingivalis* Infection. *J Dent Res.* 80, 1875-1879.

Guidet, B., Staikowsky, F., Offenstadt, G., 1993. Interleukins and TNF in septic shock. *Rev Prat.* 43,13-7.

Imatani, T., Kato, T., Okuda, K., 2001. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 16, 65-72.

Kadono, H., Kido, J., Kataoka, M., Yamauchi, N., Nagata, T., 1999. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 67, 2841-2846.

Kato, T., Tsuda, T., Inaba, H., Kawai, S., Okahashi, N., Shibata, Y., Abiko, Y., Amano, A., 2008. *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause G₁ arrest in osteoblastic/stromal cells. *Oral Microbiol Immunol.* 23, 158-164.

Kiji, M., Nagasawa, T., Hormdee, D., Yashiro, R., Kobayashi, H., Noguchi, K., Nitta, H., Izumi, Y., Ishikawa, I., 2007. Internal prostaglandin synthesis augments osteoprotegerin production in human gingival fibroblasts stimulated by lipopolysaccharide. *Clin Exp Immunol.* 149, 327-334.

Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuoka, M., Yamamoto, G., Hishikawa, T., Noguchi, T., Yoshikai, Y., 2001. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol.* 166, 3574-3579.

Kumagai, Y., Yahishita, H., Yajima, A., Okamoto, T., Konishi, K., 2005. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 73, 2655-2664.

Lamont, R.J., Yilmaz, Ö., 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000.* 30, 61-69.

Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 15, 341-349.

Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., 1998. Life Below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 1244-1263.

Lamont, R.J., Chan, A., Belton, C.M., Izutsu, K.T., Vasel, D., Weinberg, A., 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 63, 3878-3885.

- Li, L., Michel, R., Cohen, J., DeCarlo, A., Kozarov, E., 2008. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. BMC Microbiol 8, 1-11.
- Madianos, P.N., Papapanou, P.N., Nannmark, U., Dahlén, G., Sandros, J., 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 Multiplies and Persists within human Oral Epithelial Cells In Vitro. Infect Immun. 74, 660-664.
- Mahanonda, R., Sa-Ard-lam, N., Montreekachon, P., Pimkhaokham, A., Yongvanichit, K., Fukuda, M.M., Pichyangkul, S., 2007. IL-8 and IDO Expression by Human Gingival Fibroblasts via TLRs. J Immunol. 178, 1151-1157.
- Newman, M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A., 2002. Clinical Periodontology. 8va ed. Sanders;16-58, 64-74, 96-101,132-156.
- Ohno, T., Okhashi, N., Morisaki, I., Amano, A., 2008. Signaling pathways in osteoblast proinflammatory responses to infection by *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol. 23, 96-104.
- Okahashi, N., Inaba, H., Ichiro, N., Yamamura, T., 2004. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator de NF- κ B ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. Infect Immun. 72, 1706-1714.
- Rajashri, G.D., Mahfuz, B.K., Caroline, A.G., 1998. Invasion of Aortic and Heart Endothelial Cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 66, 5337-5343.
- Riancho, J.A., Gutiérrez, G.A., 2003. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. Metabolismo Óseo y Mineral. 1, 51-66.
- Roberts, H.C., Moseley, R., Sloan, A.J., Youde, S.J., Waddington, R.J., 2008. Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts: consequences for bone repair during periodontal disease. Eur J Oral Sci. 116, 207-216.
- Ruby, J., Barbeau, J., 2002. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. Can J Infect Dis. 13, 34-41.
- Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, D.D., Boyan, B.D., 1997. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontol 2000. 14, 158-172.
- Silva, N., Dutzan, N., Hernández, M., Dezereaga, A., Rivera, O., Aguillon, J.C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R., Gamonal, J., 2008. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. J Clin Periodontol. 35, 206-214.
- Sun, Y., Shu, R., Zhang, M-Z., Wu, A-P., 2008. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. Immunol Med Microbiol. 52, 362-369.

Tabeta, K., Yamazaki, K., Akashi, S., Miyake, K., Kumada, H., Umemoto, T., Yoshie, H., 2000. Toll-Like Receptors Confer Responsiveness to Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in Human Gingival Fibroblasts. *Infect Immun.* 68, 3731-3735.

Topazian, R., Goldberg, M.H., Hupp, J.R., 2002. Oral and maxillofacial infections. 4th edition. Saunders; 30-40, 126-142.

Urnowey, S., Ansai, T., Bitko, V., Nakayama, K., Takehara, T., Barik, S., 2006. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiol.* 6, 1-15.

Wang, P.L., Ohura, K., 2002. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signalling in gingival fibroblasts CD14 and Toll-Like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13, 132-142.

Yamatake, K., Maeda, M., Kadowaki, T., Takii, R., Tsukuba, T., Ueno, T., Kominami, E., Yokota, S., Yamamoto, K., 2007. Role for Gingipains in *Porphyromonas gingivalis* Traffic to Phagolysosomes and Survival in Human Aortic Endothelial Cells. *Infect Immun.* 75, 2090-2100.

Yilmaz, Ö., 2008. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology.* 154, 2897-2903.

Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H., Galicia, J.C., 2007. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000.* 43, 102-132.

Zahlten, J., Riep, B., Nichols, F.C., Walter, C., Schmeck, B., Bernimoulin, J.P., Hippenstiel, S., 2007. *Porphyromonas gingivalis* dihydroceramides induce apoptosis in endothelial cells. *J Dent Res.* 86, 635-640.

Zou, W., Amchevslasky, A., Bar-Zhavit, Z., 2003. Cpg Oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via Toll-like receptor 9. *J Biol Chem.* 278, 16732-16740.