



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE *Porphyromonas gingivalis*  
EXPUESTA A CLORHEXIDINA AL 0.20%.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

KAREN IVETTE MEJÍA AMADOR

TUTORA: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, claves de proyectos: **IA206522** e **IN206420**, por el apoyo proporcionado para la realización del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Miryam Martínez Hernández y el Dr. Enrique Romo Arévalo por su tiempo, enseñanzas y apoyo para la realización de este proyecto, y sobre todo por la confianza que pusieron en mí y en mis capacidades para lograr esta investigación.

A mis padres, Josefina Amador Téllez y Juan Remigio Mejía Martínez por su esfuerzo y apoyo que me han brindado a lo largo de toda mi educación, por toda la motivación que me dan para seguir adelante y lograr todo lo que me proponga.

A mi hermana Alex, le agradezco todo lo que he logrado, por su amor, compañía. Por estar conmigo y para mí cuando lo necesito y llego a sentir que no puedo más. Gran parte de la persona que soy ahora se lo debo a ella.

A mis amigos especialmente a Said, agradezco su compañía, cariño, su motivación constante, su desinteresada ayuda a lo largo de esta etapa y los buenos momentos compartidos.

# INDICE

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
2.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL.      8	
2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .      9	
2.3 CONTROL MECÁNICO Y QUÍMICO DE LAS BIOPELÍCULAS ORALES.    11	
2.4 CLORHEXIDINA (CHX).      12	
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN. ....</b>	<b>13</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>5. HIPÓTESIS. ....</b>	<b>14</b>
<b>6. OBJETIVOS. ....</b>	<b>14</b>
6.1 OBJETIVO GENERAL.      14	
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.   15	
<b>7. MATERIALES. ....</b>	<b>15</b>
7.1 RECURSOS HUMANOS.      15	
7.2 RECURSOS MATERIALES PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS.   15	
7.3 RECURSOS MATERIALES PARA LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA.   16	
7.4 RECURSOS MATERIALES PARA LOS ENSAYOS PROTEÓMICOS.      16	
<b>8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA. ....</b>	<b>17</b>
8.1 CULTIVO DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> .      17	
8.2 PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA.   17	
8.3 ENSAYOS PROTEÓMICOS.   18	
8.3.1 Identificación proteómica por espectrometría de masas.      19	
8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.      21	
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
9.1 Inhibición de <i>Porphyromonas gingivalis</i> después de ser expuesta a clorhexidina al 0.20% durante 1 min.   22	

9.2 Identificación de los cambios en el proteoma de <i>Porphyromonas gingivalis</i> derivados de su exposición durante un minuto a clorhexidina al 0.20%.	23
9.2.1 Análisis electroforético.	23
9.2.2 Identificación proteica.	24
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>

## RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo identificar los cambios en el proteoma de *Porphyromonas gingivalis* tras ser expuesta a clorhexidina (CHX) al 0.20% durante 1 minuto bajo agitación constante. Para los ensayos de inhibición bacteriana e identificación proteómica se utilizó la cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, crecida en agar enriquecido con HK (vitamina K y Hemina) en una cámara de anaerobiosis. Para las pruebas de inhibición bacteriana se recolectó el crecimiento bacteriano de la superficie del agar y se colocó en tubos Falcon de 30 mL con caldo enriquecido con HK, los cuales fueron adicionados con CHX al 0.20%, el porcentaje de inhibición bacteriana fue determinado mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's). Para la identificación proteómica, el extracto proteico de la cepa *P. gingivalis* expuesta a CHX al 0.20% durante un minuto fue evaluado electroforéticamente en un gel de SDS-PAGE 1D para evaluar la integridad de las proteínas extraídas. Finalmente, la identificación de las proteínas presentes en cada una de las muestras, experimental y control, se llevó a cabo mediante una aproximación por espectrometría de masas (MS).

Se identificó que *Porphyromonas gingivalis* al estar expuesta a CHX al 0.20% durante un minuto redujo su crecimiento en un 93%. Por otro lado, de acuerdo con la identificación proteica, 137 diferentes proteínas fueron expresadas, de las cuales 9 fueron exclusivamente identificadas en el grupo control, 94 exclusivamente en el grupo experimental y 34 fueron encontradas en ambos grupos. Asimismo, se identificó que la proteína de mayor abundancia expresada por *P. gingivalis* expuesta a CHX al 0.20% fue la gingipaina de lisina la cual tiene la capacidad de unirse a los glóbulos rojos y actúan como una enzima proteolítica para producir y almacenar hierro, y actúa como un factor importante para el crecimiento de *P. gingivalis*.

**Palabras clave:** *Porphyromonas gingivalis*, clorhexidina, perfil proteómico, periodontitis, factores de virulencia.

## ABSTRACT

The present study aimed to identify changes in the proteome of *Porphyromonas gingivalis* after exposure to 0.20% chlorhexidine (CHX) for 1 minute under constant agitation. For bacterial inhibition and proteomic identification assays, *Porphyromonas gingivalis* strain, ATCC 33277, grown on agar enriched with HK (vitamin K and Hemin) in an anaerobic chamber, was used. For bacterial inhibition tests, bacterial growth was collected from the agar surface and placed in 30 mL Falcon tubes with broth enriched with HK, which were added with 0.20% CHX; the percentage of bacterial inhibition was determined by counting colony forming units (CFU's). For proteomic identification, the protein extract of the *P. gingivalis* strain exposed to 0.20% CHX for one minute was electrophoretically evaluated on a 1D SDS-PAGE gel to assess the integrity of the extracted proteins. Finally, the identification of the proteins presents in each of the samples, experimental and control, was carried out by a mass spectrometry (MS) approach.

It was identified that *Porphyromonas gingivalis* when exposed to 0.20% CHX for one minute reduced its growth by 93%. On the other hand, according to protein identification, 137 different proteins were expressed, of which 9 were exclusively identified in the control group, 94 exclusively in the experimental group and 34 were found in both groups. Likewise, it was identified that the most abundant protein expressed by *P. gingivalis* exposed to 0.20% CHX was lysine gingipain which can bind to red blood cells and act as a proteolytic enzyme to produce and store iron, and acts as an important factor for the growth of *P. gingivalis*.

**Key words:** *Porphyromonas gingivalis*, chlorhexidine, proteomic profile, periodontitis, virulence factors.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La cavidad oral está colonizada por distintos tipos de microorganismos, como parte de su microbiota residente encontramos especies del género *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Rothia* y *Veillonella*. También, podemos encontrar especies como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, las cuales han sido asociadas directamente con la presencia y severidad de la enfermedad periodontal. Las enfermedades periodontales constituyen un grupo de condiciones inflamatorias crónicas causadas principalmente por una biopelícula disbiótica, que afectan a los tejidos duros y blandos del periodonto [1, 2].

La colonización microbiana en las superficies expuestas en la cavidad oral ocurre gracias a la presencia de la película salival adquirida (PSA), la cual es una estructura microscópica acelular formada por la adsorción de macromoléculas de la saliva y el fluido crevicular, principalmente. Esta película acondicionante desempeña funciones particulares, por un lado, posee funciones antimicrobianas, ya que en su composición encontramos proteínas como lisozima, mucina, y aglutininas entre otras, las cuales desempeñan funciones antibacterianas cuando se encuentran adsorbidas en la superficie dental. Por otro lado, proteínas como  $\alpha$ -amilasa, proteínas ricas en prolina, histatinas, entre otras, dictarán la secuencia de colonización bacteriana sobre las superficies de esmalte de los dientes [3].

Los microorganismos adheridos a las superficies dentales se organizan en forma de biopelículas, formadas sobre la PSA previamente formada. Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos adheridas a una superficie expuesta y rodeadas por una matriz de exopolisacáridos. Se ha identificado que las biopelículas se forman en dos etapas, en la primera de ellas hay una adherencia bacteriana reversible a la superficie, mientras que en la segunda se establece una adherencia bacteriana irreversible a la superficie ya colonizada. Cuando las proporciones de microorganismos

dentro de una biopelícula se encuentran alteradas, el equilibrio se rompe y ocurre una disbiósisis de la biopelícula. La presencia de una biopelícula dental disbiótica ha sido identificada como el factor etiológico principal para la aparición y desarrollo de las enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis. Socransky y cols., identificaron relaciones específicas entre las bacterias de la biopelícula dental, dichas asociaciones fueron descritas como complejos bacterianos: “complejo morado”, “complejo verde”, “complejo amarillo”, “complejo naranja” y “complejo rojo”, en este último complejo, también denominado complejo de bacterias periodontopatógenas, se encuentran agrupadas las bacterias directamente asociadas con la enfermedad periodontal: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*. Las enfermedades periodontales representan un problema de salud pública, actualmente la periodontitis es considerada la 6ta enfermedad más prevalente a nivel mundial. Se ha reportado que 750 millones de personas presentan enfermedad periodontal en el mundo, específicamente en México hasta el 70% de la población sufre este padecimiento, el cual afecta principalmente a la población adulta mayor de 65 años [4].

El cepillado dental es considerado la piedra angular para el control del crecimiento de las biopelículas orales. Desafortunadamente, el cepillado dental no es realizado adecuadamente por la población general, ya que depende directamente de las habilidades de coordinación o motoras del paciente, influyendo, además, el estado periodontal y la edad de este, por lo que el control químico constituye el complemento ideal para el control del crecimiento bacteriano en superficies orales no accesibles al cepillado dental. Actualmente, los enjuagues bucales más comúnmente utilizados son aquellos compuestos por aceites esenciales (Listerine®), cloruro de cetilpiridino y clorhexidina (CHX), este último es considerado el estándar de oro de los antisépticos orales ya que posee capacidad bactericida y/o bacteriostática sobre bacterias de la biopelícula dental. CHX posee un efecto importante sobre *P. gingivalis* afectando su

membrana celular e interfiriendo con su metabolismo. Debido a lo anterior y tomando en cuenta el papel principal que tiene la CHX en el control de crecimiento de *P. gingivalis*, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo identificar los cambios en el proteoma de *P. gingivalis* derivados de su exposición durante un minuto a CHX al 0.20%.

## 2. MARCO TEÓRICO.

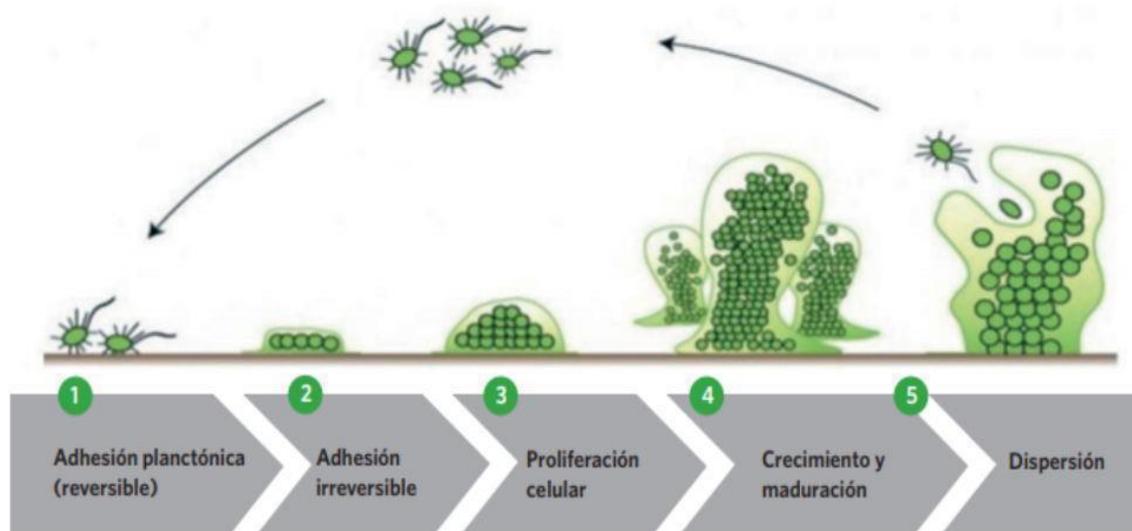
La cavidad oral representa un ecosistema complejo compuesto por diferentes superficies, cada una de ellas colonizadas por diversos microorganismos. De acuerdo con la última actualización de la base de datos ampliada del microbioma oral humano (eHOMD por sus siglas en inglés) se reportaron aproximadamente 772 especies bacterianas procariotas, de las cuales el 70% son cultivables y el 30% no-cultivables [5]. Como parte de la microbiota oral podemos encontrar especies del género *Streptococcus* en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y lengua, especies del género *Actinomyces* a nivel supragingival, subgingival y en las fisuras de la lengua [1], además, encontramos especies como *Rothia* y *Veillonella*, todos ellos asociadas con un estado de salud periodontal [6].

Por otro lado, asociadas con la enfermedad periodontal encontramos en aumento especies como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, mientras que en presencia de caries dental es posible encontrar mayores proporciones de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillos* spp. y *Bifidobacterium* spp [7].

La colonización microbiana en las superficies orales es posible gracias a la formación de una película acondicionante, esta película acondicionante recibe el nombre de Película Salival Adquirida (PSA), la cual se define como una película fina acelular formada por la adsorción de macromoléculas de los fluidos orales, como la saliva y el fluido crevicular, y sirve como película protectora contribuyendo al mantenimiento de la salud bucal [3]. El proceso de formación de esta película acondicionante es dinámico y

comienza inmediatamente después del pulido o limpieza dental con la adsorción de péptidos, proteínas, lípidos y carbohidratos sobre la superficie limpia, esta PSA se puede ver al microscopio electrónico como una capa basal densa en electrones [8].

En la cavidad oral, las bacterias preferentemente se organizan en forma de biopelículas, las cuales son comunidades de microorganismos envueltas en una matriz de exopolisacáridos que se adhieren a las superficies expuestas [9], dichas estructuras microbianas se forman directamente sobre la PSA, la cual proporciona receptores específicos que dictarán la secuencia de colonización bacteriana [10]. Se ha reportado que las biopelículas se organizan en dos estadios, en el primero de ellos las bacterias planctónicas de libre flotación se adhieren reversiblemente a una superficie, en el segundo estadio las bacterias reversiblemente adheridas a la superficie dental forman microcolonias y producen una matriz polimérica alrededor de ellas. Las biopelículas bien organizadas y maduras tienden a liberar células bacterianas individuales para colonizar otros sitios distantes, lo que permite el desarrollo de nuevas comunidades microbianas en los diversos sitios anatómicos disponibles en la cavidad oral [11, 12]. Las biopelículas complejas formadas sobre las superficies orales son el principal factor etiológico de la caries y de las enfermedades periodontales.

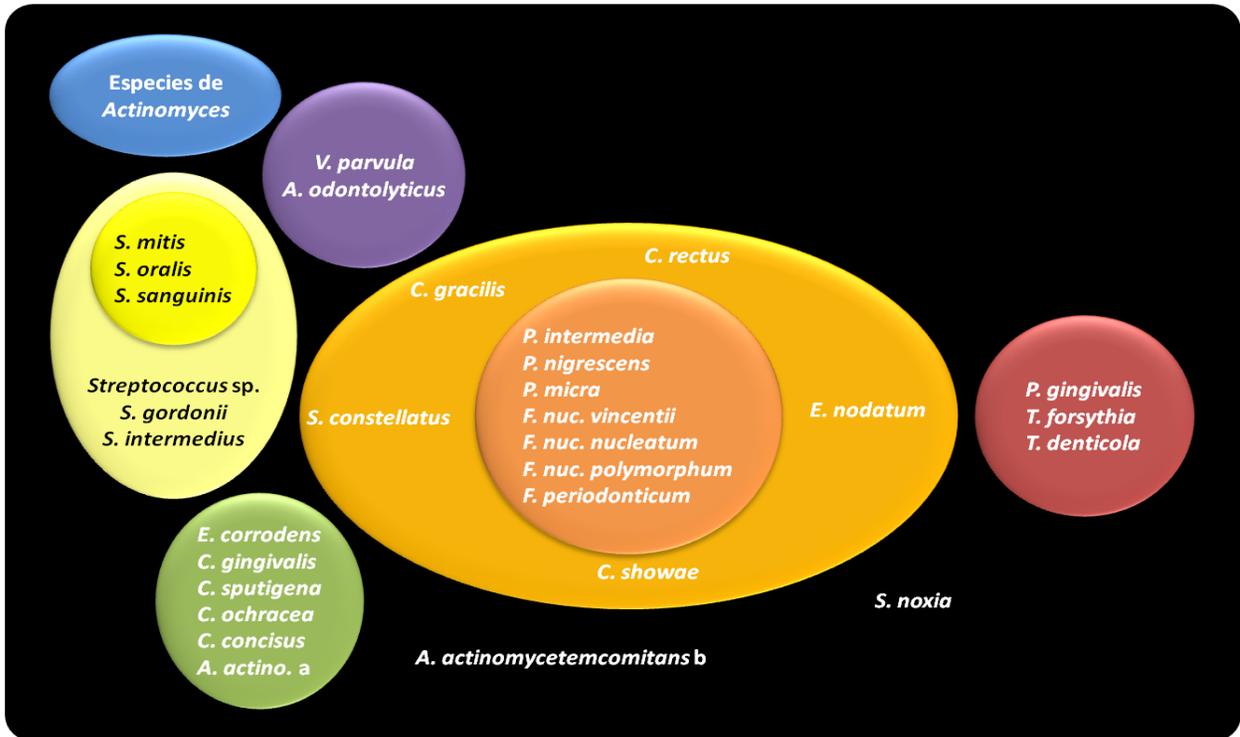


**Fig. 1** Etapas de formación de la biopelícula. (1) Las bacterias planctónicas de libre flotación se adhieren reversiblemente a la superficie. (2) Las bacterias se adhieren irreversiblemente a la superficie, forman microcolonias. (3) Crecimiento y maduración de la biopelícula. (4) Dispersión.

## **2.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL.**

Las enfermedades periodontales se definen como condiciones inflamatorias crónicas de etiología principalmente bacteriana que afectan a los tejidos duros y blandos del periodonto; dentro de las enfermedades periodontales encontramos a la periodontitis y a la gingivitis [2]. De acuerdo con la última clasificación de enfermedades y condiciones periodontales, la periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada con una biopelícula disbiótica, que se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales [13], mientras que la gingivitis es considerada como una afección inflamatoria sitio-específica iniciada por la acumulación de biopelícula dental, la cual se caracteriza por enrojecimiento, edema gingival y la ausencia de pérdida de la inserción periodontal [14].

Las bacterias que forman parte de la biopelícula supra y subgingival han sido sujetas a estudio profundo, y se describen asociadas en complejos bacterianos. Socransky y cols. describen el primero de ellos como el “complejo morado” compuesto por las especies bacterianas *Neisseria mucosa* y *Veillonella párvula*; el “complejo verde” formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *C. ochracea* y *C. concisus*; el “complejo amarillo” está formado principalmente por *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* y *S. intermedius*; mientras que el “complejo naranja” está compuesto por *Campylobacter showae*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum. subsp. vincentii*, *Fusobacterium periodonticum*, *F. nucleatum subsp. polymorphum*, *Campylobacter gracilis*, *Prevotella intermedia*, y *Prevotella nigrescens*; y por último el “complejo rojo” formado por *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola* [4, 15].



**Fig. 2.** Complejos bacterianos de la biopelícula subgingival. Fuente propia.

## **2.2 Porphyromonas gingivalis.**

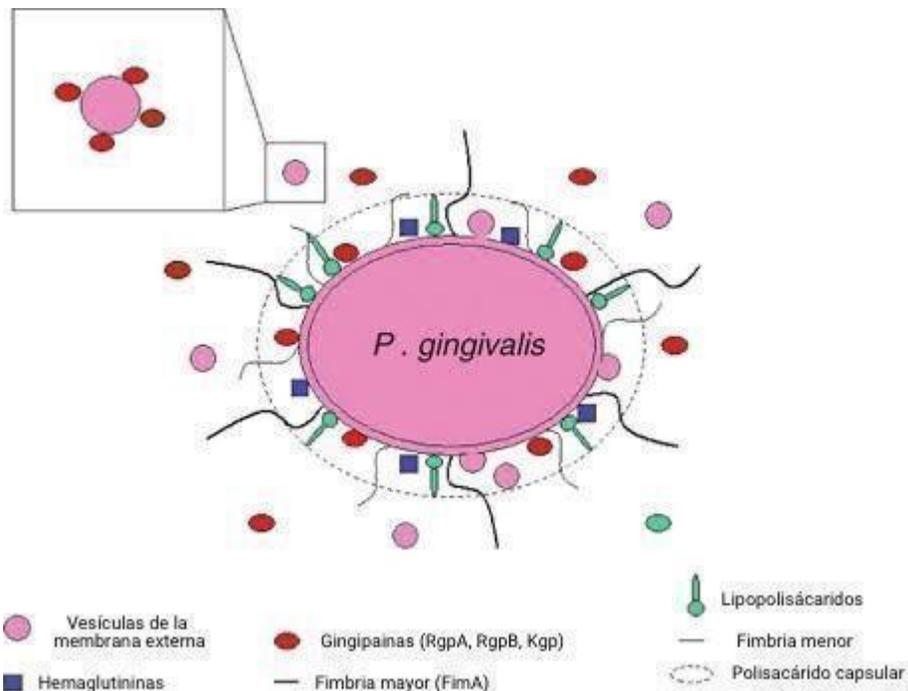
Es una bacteria Gram negativa anaerobia, asociada principalmente a la patogenia de la periodontitis [16], obtiene la energía metabólica para su crecimiento a través de la degradación de proteínas y vitamina K [17], para acceder a los aminoácidos y péptidos, *P. gingivalis* secreta una amplia variedad de proteasas que degradan proteínas exógenas para generar péptidos que ingresan al periplasma bacteriano donde se van a romper en dipéptidos o tripéptidos por las dipeptidil peptidasas antes de ser transportados al citoplasma por los transportadores de oligopéptidos [18].

Esta especie bacteriana expresa una serie diversa de factores de virulencia, como fimbrias, que son estructuras filamentosas localizadas en la superficie de la bacteria que le permite invadir los tejidos periodontales y colonizar la cavidad oral, este microorganismo expresa dos distintos tipos de fimbrias, las primeras se componen de la subunidad proteica denominada fimA, codificada por el gen fimA, llamadas fimbrias largas

(long fimbria), mientras que las segundas se compone de la subunidad proteica Mfa codificada por el gen *mfa1* y son denominadas fimbrias cortas [19].

Otros factores de virulencia que posee *P. gingivalis* son las enzimas proteolíticas, además de los lipopolisacáridos (LPS) propios de su conformación Gram negativa, los cuales contienen 3 componentes estructurales: polisacáridos en el exterior, oligosacáridos en el centro y lípido A en su interior [20]. Además, *P. gingivalis* produce gingipainas, las cuales pertenecen a una familia de cistein-proteasas. Las gingipainas se pueden dividir en dos categorías: gingipainas específicas de arginina (RgpA y RgpB) y gingipainas específicas de lisina (Kgp), se producen en secreciones o formas asociadas a la membrana en la superficie celular [21]. Estas proteasas siguen siendo tema de estudio profundo debido a su papel relevante asociada con la patogenicidad de *P. gingivalis*.

También, encontramos la presencia de hemaglutininas en la superficie celular de *P. gingivalis*, las cuales están asociadas con su virulencia, además de estar asociadas con estructuras filamentosas como las fimbrias, y con componentes de la superficie no-fimbriar como las adhesinas no-fimbriales que son los componentes estructurales con los cuales la bacteria se adhiere a las células mamíferas [22].



**Fig. 3.** Componentes estructurales de *Porphyromonas gingivalis*.

Dado el papel crucial que juega *P. gingivalis* en la patogenia de la enfermedad periodontal, diversos agentes químicos antimicrobianos como la clorhexidina (CHX) han sido empleados para el control de su crecimiento. Se ha observado que la CHX a bajas concentraciones, 0.05%, tiene una función bacteriostática sobre *P. gingivalis*, interfiriendo en el metabolismo bacteriano, inhibiendo el transporte de azúcares y producción de ácidos, mientras que, en altas concentraciones, 0.20%, CHX actúa como bactericida, dañando la membrana de la célula bacteriana [23, 24].

### **2.3 CONTROL MECÁNICO Y QUÍMICO DE LAS BIOPELÍCULAS ORALES.**

Desde que se estableció el papel esencial que juega la biopelícula dental como el agente etiológico de las enfermedades periodontales, la remoción mecánica de la biopelícula formada sobre las superficies de los dientes es considerada la piedra angular para el mantenimiento de la salud oral [25, 26]. A pesar de que el cepillado dental, como método de control mecánico de las biopelículas orales, es una estrategia muy difundida y de eficacia probada, puede verse limitada por factores como: el desconocimiento por parte del paciente de la técnica correcta de cepillado dental, la presencia de zonas retentivas como obturaciones desbordantes o prótesis mal ajustadas, además de no ser utilizada de forma regular por muchos pacientes [27]. Se ha demostrado que el control mecánico por sí solo no es suficiente para prevenir la aparición y desarrollo de las enfermedades periodontales [28], por lo que se recomienda el uso complementario de enjuagues antimicrobianos para reforzar el control del crecimiento y desarrollo de las biopelículas orales [29].

Los agentes químicos presentes en los enjuagues bucales son capaces de alcanzar las superficies no accesibles al cepillado dental convencional, de esta forma, contribuyen al control del crecimiento de las biopelículas orales [30]. Actualmente, los

agentes químicos más utilizados en la práctica clínica odontológica para control del crecimiento de las biopelículas orales son los colutorios formulados con aceites esenciales (Listerine®), cuya composición fija consiste en timol al 0,064% y eucaliptol al 0,092%, mezclados con mentol al 0,042% y salicilato de metilo al 0,060% en un vehículo de alcohol al 22%. Colutorios formulados con cloruro de cetilpiridino, el cual es un compuesto de amonio cuaternario catiónico con propiedades tensioactivas que tiene la capacidad de interactuar con la membrana celular bacteriana provocando la pérdida de componentes celulares, interrupción del metabolismo, inhibición del crecimiento y finalmente induce la muerte celular microbiana. Finalmente, enjuagues bucales con clorhexidina (CHX), la cual es una biguanida catiónica activa contra organismos Gram positivos, Gram negativos, anaerobios, aerobios y levaduras [31].

#### **2.4 CLORHEXIDINA (CHX).**

La clorhexidina (CHX) es un compuesto químico perteneciente al grupo de las biguanidas catiónicas que posee un amplio espectro antimicrobiano, en 1953 se introdujo por primera vez en la medicina clínica en presentación de crema antiséptica [29]. El primer uso de la CHX en la práctica odontológica fue para la limpieza y desinfección de los conductos radiculares y para la desinfección prequirúrgica de la cavidad oral [32]. La CHX es una molécula hidrofóbica y lipofílica cargada positivamente que interactúa con los fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular bacteriana, y tiene la capacidad de ingresar a la célula bacteriana mediante mecanismos de transporte activos o pasivos [33].

El mecanismo de acción de la CHX se basa en su capacidad para producir un daño a la membrana celular bacteriana y consecuentemente provocar la fuga de los componentes citoplasmáticos [34]. Løe y Schiött en 1970, reportaron la inhibición total en la formación de biopelícula sobre superficies dentales y la reducción de la gingivitis con la

utilización del enjuague bucal con CHX al 0.20%. Además, se ha reportado que la CHX al 0.20% posee un efecto antibiopelícula importante a las 24 hrs - 48 hrs [35], dicho efecto se puede explicar por la alta retención de la CHX en las superficies dentales [36]. La literatura también reporta que la CHX reduce eficazmente la presencia de las bacterias formadoras de biopelícula dental como *P. gingivalis* [33], afectando su hemaglutinación y disminuyendo su capacidad de adherencia a las células epiteliales [37].

En un estudio *in vitro* realizado por Daniel Grenier y colaboradores en 1995 demostró que a nivel molecular la CHX interactúa directamente con las vesículas externas de *P. gingivalis*, dicha interacción, a su vez, se relacionó con la pérdida total de la actividad bactericida de CHX. En el mismo estudio, se confirmó que los lipopolisacáridos de *P. gingivalis* son los principales componentes implicados en la unión de las vesículas externas bacterianas a CHX. En 1996 en otro estudio *in vitro* realizado por Grenier se demostró que el pretratamiento de *P. gingivalis* durante 2 horas con CHX al 0.002%, 0.02% y 0.20% redujo su capacidad de adherencia a células epiteliales y eritrocitos, dicha disminución en la adherencia bacteriana fue directamente dependiente de la concentración empleada. En este mismo estudio se demostró que CHX al 0.2% reduce la hemaglutinación de *P. gingivalis*, provocando también una disminución en la hidrofobicidad de la superficie celular de la bacteria.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.**

Actualmente, la periodontitis es la sexta enfermedad más prevalente a nivel mundial y la primera causa de pérdida dental en la población adulta, esto último afecta severamente de la calidad de vida de las personas que la padecen. La presencia de una biopelícula disbiótica sobre las superficies dentales es la principal causa etiológica de las enfermedades periodontales, ya que alberga dentro de su composición altas proporciones de bacterias periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis*.

*P. gingivalis* es reconocida como uno de los principales patógenos involucrados en el desarrollo de la periodontitis debido a que expresa diferentes factores de virulencia como proteasas, fimbrias, lipopolisacáridos y adhesinas, los cuales pueden causar destrucción tisular periodontal e inducir una respuesta inmune-inflamatoria en el huésped. En años recientes, *P. gingivalis* ha sido relacionada también con otras enfermedades como la artritis reumatoide, diabetes, Alzheimer y enfermedades cardíacas.

La CHX representa un elemento importante en la práctica clínica odontológica para el manejo de las enfermedades periodontales ya que ha probado ser el agente antibiopelícula más efectivo, por lo que es considerado el estándar de oro de los antisépticos orales. Se sabe que la CHX tiene un efecto directo sobre *P. gingivalis* a nivel molecular, sin embargo, su efecto en la expresión de proteínas en esta bacteria periodontopatógena no ha sido estudiada, por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la CHX al 0.20% en el perfil proteómico de *P. gingivalis*.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Cuáles son los cambios que ocurren en el proteoma *Porphyromonas gingivalis* tras ser expuesta a clorhexidina al 0.20% durante 1 minuto?

#### **5. HIPÓTESIS.**

El perfil proteómico de *Porphyromonas gingivalis* cambiará al ser expuesta durante un minuto a clorhexidina al 0.20%.

#### **6. OBJETIVOS.**

##### **6.1 OBJETIVO GENERAL.**

Identificar los cambios que en el perfil proteómico de *Porphyromonas gingivalis* después de ser expuesta durante un minuto a clorhexidina al 0.20%.

## **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Identificar el porcentaje de inhibición de *Porphyromonas gingivalis* después de ser expuesta a clorhexidina al 0.20% durante 1 min.
2. Evaluar los cambios en el perfil proteómico de *Porphyromonas gingivalis* después de estar expuesta a clorhexidina al 0.20% durante 1 min.
3. Identificar las proteínas expresadas por *Porphyromonas gingivalis* después de estar expuesta a clorhexidina al 0.20% durante 1 min.

## **7. MATERIALES.**

### **7.1 RECURSOS HUMANOS:**

- Tutora y asesor de tesis.
- Tesista estandarizada para el manejo de los equipos de laboratorio y realización de pruebas bacterianas.

### **7.2 RECURSOS MATERIALES PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS:**

- Cepa *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.
- Cámara de anaerobiosis.
- Incubadora orbital con control de temperatura.
- Placas de agar HK.
- Asas bacteriológicas.
- Tubos de caldo enriquecidos HK.
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L,
- Tubos Falcon.

### **7.3 RECURSOS MATERIALES PARA LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN**

#### **BACTERIANA:**

- Cámara de anaerobiosis.
- Espectrofotómetro.
- Clorhexidina al 0.20%.
- Placas de agar HK.
- Tubos de caldo enriquecidos HK.
- Tubos Falcon.
- Centrifuga refrigerada.
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L,
- Puntas de pipetas (azules y amarillas).
- Pipetas Pasteur.
- Asas bacteriológicas.

### **7.4 RECURSOS MATERIALES PARA LOS ENSAYOS PROTEÓMICOS:**

- Espectrofotómetro.
- Tubos Falcon.
- Centrifuga refrigerada.
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L.
- Puntas de pipetas (azules y amarillas).
- Equipo para electroforesis.
- Espectrómetro de Masas Modelo Synapt G2S, Marca WATERS, con tiempo de Vuelo.
- Software Protein Lynx Global Server 2.5.1™; Waters (PLGS).

## **8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA.**

### **8.1 CULTIVO DE *Porphyromonas gingivalis*:**

La cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue obtenida de cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). La cepa bacteriana fue crecida en agar enriquecido HK (agar soya Trypticase, con agar cerebro-corazón y levadura), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, (vitamina K), 5 µg/mL de hemina y 5% de sangre de carnero desfibrinada a 35 °C en una cámara de anaerobísis en condiciones atmosféricas de 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub>, durante 48 horas. Posteriormente, se propagó y transfirió hasta obtener cultivos puros.

### **8.2 PRUEBAS DE INHIBICIÓN BACTERIANA:**

De los cultivos puros de *P. gingivalis*, se recolectó el crecimiento de la superficie del agar y se colocó en tubos Falcon de 30 mL con caldo enriquecido HK (caldo soya Trypticase, con infusión cerebro-corazón), suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina. Posteriormente, se ajustó la densidad óptica (OD) a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm para obtener el mismo número de células/mL para cada ensayo. Tubos Falcon de 30 mL se adicionaron con una suspensión de 10<sup>7</sup> células/mL de *P. gingivalis*. Los tubos Falcon adicionados con las células bacterianas se incubaron durante 48 horas a 35 °C en una cámara de anaerobiosis bajo condiciones atmosféricas de 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub>. Posteriormente, cada tubo Falcon con la cepa bacteriana se le adicionó clorhexidina al 0.20% durante un minuto bajo agitación constante. Posteriormente, se realizaron 4 diluciones seriadas (-1, -2, -3 y -4) de cada tubo Falcon y 100 µL de cada una de las diluciones seriadas se sembraron en placas de agar enriquecido. Transcurridos 5 días de incubación anaerobia se realizó el conteo visual de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) para determinar el porcentaje de inhibición de *P. gingivalis* derivado de su exposición a clorhexidina al 0.20%

durante 1 min. Como control del crecimiento se utilizaron los tubos con medio y el inóculo del microorganismo sin la adición de CHX.

### **8.3 ENSAYOS PROTEÓMICOS:**

Procediendo de forma similar a los ensayos anteriores, tubos Falcon de 30 mL se adicionaron con una suspensión de  $10^7$  células/mL de *P. gingivalis*. Los tubos Falcon adicionados con las células bacterianas se incubaron durante 48 horas a 35 °C en una cámara de anaerobiosis bajo condiciones atmosféricas de 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub>. Posteriormente, cada tubo Falcon con la cepa bacteriana se le adiciono clorhexidina al 0.20% durante un minuto bajo agitación constante. Posteriormente, cada tubo Falcon se centrifugó a 8000 g, 4 °C, durante 16 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla resultante se maceró utilizando un politrón, para lo cual, la pastilla se suspendió en 6 mL de fenol pH 8.8 y 5 mL de buffer de extracción (100mM tris HCl, pH 8.8, 10mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-betamercaptoetanol), se aplicaron 5 pulsos de 1 min en el politrón alternados por 1 min en hielo, después de los 5 pulsos se mantuvieron en hielo 10 min más y se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min, se tomó la fase orgánica y se depositó en un tubo de 50 mL nuevo y se agregó 25 mL de acetato de amonio 100mM en metanol, la muestra se dejó reposar 16hrs a -20 °C.

Posteriormente, se realizó una centrifugación de la muestra a 4000 rpm durante 30 min para obtener una pastilla de precipitado y se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 5mL de acetato de amonio en metanol 2 veces y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min después de cada lavado. A continuación, se cuantificó la cantidad de proteínas presentes en la muestra en un Nanodrop 2000 y se analizó la integridad de las proteínas extraídas en un gel de SDS-PAGE 1D.

Posteriormente, la identificación de las proteínas presentes en cada una de las muestras, experimental y control, se llevó a cabo mediante una aproximación por espectrometría de masas (MS), como se indica a continuación.

### 8.3.1 Identificación proteómica por espectrometría de masas:

Las bandas de gel se cortaron en fragmentos más pequeños y se destiñeron con metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) en una proporción 1:1 de cada uno, por 12 horas. Se lavaron con agua destilada y se incubaron en una solución de bicarbonato de amonio 100 mM durante 15 minutos (dos veces). Posteriormente se redujeron con ditioneitol 50 mM durante 45 minutos y se alquilaron con yodoacetamida 30 mM durante dos horas. Se lavaron tres veces con bicarbonato de amonio 100 mM. Se deshidrataron completamente con acetonitrilo al 100% y se llevaron a sequedad total.

Se llevó a cabo una digestión de las proteínas de los fragmentos de gel por incubación de estas con 30 µl de tripsina de porcino modificada, a una concentración de 20 ng/µl durante 18 horas a 37 °C.

Los péptidos de la digestión anterior se extrajeron con acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido fórmico 5% (v/v) mediante sonicación, después se llevaron a sequedad total, se disolvieron de nuevo en 20 µl de ácido fórmico al 1% (v/v), se desalaron y concentraron por Ziptip C18, para posteriormente ser eluidas con 12 µl de fase móvil de HPLC (agua – acetonitrilo 97:3 + 0.1% de ácido fórmico).

La siguiente tabla (**Tabla 1**) describe el equipo utilizado y las condiciones empleadas para el análisis de las muestras experimental y control.

**Tabla 1.** Equipo utilizado y las condiciones empleadas para el análisis de las muestras experimental y control.

<b>Equipo utilizado</b>	<b>Espectrómetro de Masas Modelo Synapt G2S, Marca WATERS, con tiempo de Vuelo</b>
-------------------------	--

<b>Disolventes y reactivos</b>	<p>Agua grado LC-MS (Marca J.T. Baker, lote 0000183615)</p> <p>Acetonitrilo grado LC-MS (Marca J.T. Baker, lote 0000171727)</p> <p>Acido Fórmico grado Reactivo analítico (Marca J. T. Baker, lote 0000014851)</p> <p>[Glu1]-Fibrinopéptido B, lote W18071815, marca ERA.</p> <p>Waters MassPREP™ E. Coli Digest Standar, lote No. W20021711</p>
<b>Introducción de la muestra</b>	Cromatógrafo de Líquidos Modelo nanoACQUITY, Marca WATERS
<b>Columna</b>	<p>nanoACQUITY UPLC 1.8 µm, HSST3 C18, 75 µm × 150 mm.</p> <p>S/N: 01973716416209</p>
<b>Pre columna (Trap column)</b>	2G nanoAcquity UPLC Trap Column 5 µm 180 µm × 20 mm S/N 03073720616583
<b>Temperatura de la columna</b>	35 °C
<b>Fase Móvil</b>	<p>Fase A: Ac. fórmico al 0.1% en agua</p> <p>Fase B: Ac. fórmico al 0.1% en acetonitrilo</p>
<b>Velocidad de flujo de la fase móvil</b>	0.4 µL/min
<b>Gradiente cromatográfico</b>	<p>00.00 min, 7%B</p> <p>109.34 min, 40%B</p> <p>111.00 min, 85%B</p> <p>114.51 min, 85%B</p> <p>115.97 min, 7%B</p>
<b>Modo de ionización</b>	Electrospray
<b>Temperatura de la cámara de ionización</b>	70 °C
<b>Voltaje del capilar</b>	3.00 kV

<b>Voltaje del cono</b>	30 V
<b>Intervalo de masas</b>	50-2000 Da
<b>Lock Mass</b>	[Glu1]-Fibrinopéptido B
<b>Muestra Control</b>	<i>E. coli</i> 100 fmol/μL
<b>Rampa de energía de colisión en la trampa</b>	15 – 45 V
<b>Velocidad de escaneo</b>	1 s
<b>Detección de iones</b>	Positivos
<b>Resolución</b>	20,000

El software que se utilizará para el procesamiento de los datos es Protein Lynx Global Server 2.5.1™; Waters (PLGS). Para la identificación de las proteínas se usará la base de datos extraída de la página web: <https://www.uniprot.org>, para *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Para cada una de las muestras, experimental y control, se identificarán proteínas consistentes con el organismo seleccionado. Los calificadores de la identificación indican el grado de confiabilidad:

- 2= Confiabilidad ≥ 96%
- 1= Confiabilidad ~ 85%
- 0= Confiabilidad ≤ 85%

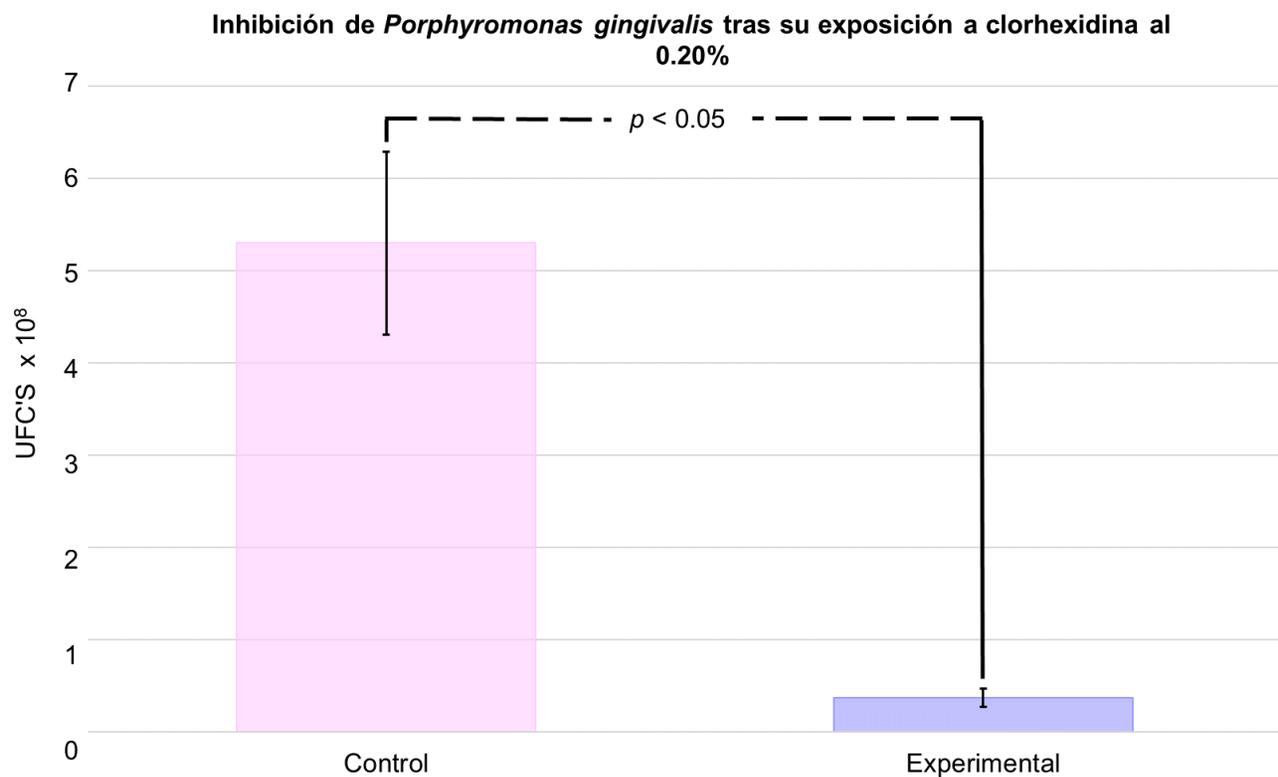
#### **8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Todas las pruebas se realizarán por triplicado en diferentes ocasiones, las lecturas microbiológicas se llevaron a cabo por medio del espectrofotómetro. Los resultados de las pruebas de inhibición bacteriana se presentan como el promedio ± el error estándar de la media (EEM), mientras que el análisis estadístico se llevó a cabo tomando en cuenta el grado de inhibición bacteriana mediante la prueba t de Student.

## 9. RESULTADOS.

### 9.1 Inhibición de *Porphyromonas gingivalis* después de ser expuesta a clorhexidina al 0.20% durante 1 min.

La capacidad inhibitoria de clorhexidina al 0.20% sobre *P. gingivalis*, en un periodo de exposición de 1 min, bajo agitación constante, fue evaluada mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) (figura 4).



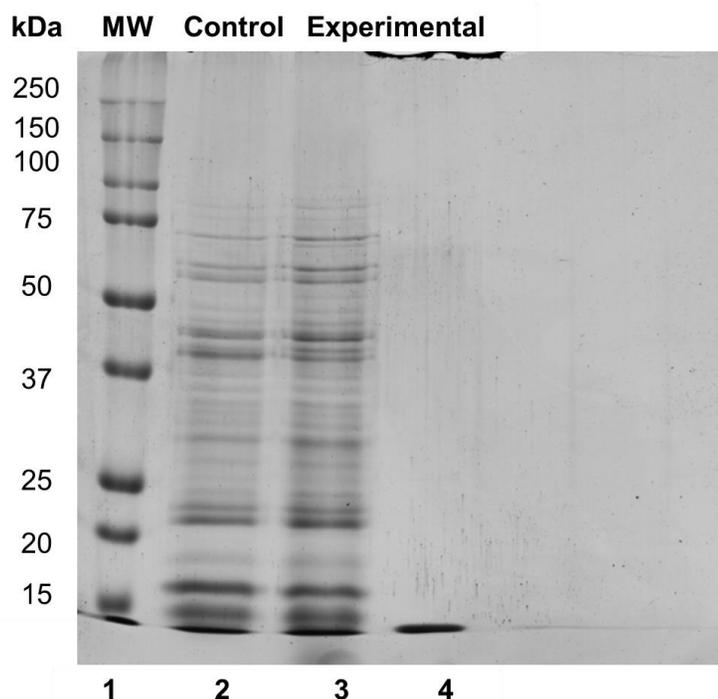
**Figura 4.** Gráfica que muestra el efecto inhibitorio de clorhexidina al 0.20% sobre *P. gingivalis*.

En promedio, en el grupo control se cuantificaron  $5.3 \times 10^7 \pm 9.94 \times 10^5$  UFCs, mientras que en el grupo experimental se cuantificaron  $3.7 \times 10^6 \pm 9.9 \times 10^5$  UFCs, dicha diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), estos resultados indican una inhibición del crecimiento bacteriano del 93%.

## 9.2 Identificación de los cambios en el proteoma de *Porphyromonas gingivalis* derivados de su exposición durante un minuto a clorhexidina al 0.20%.

### 9.2.1 Análisis electroforético.

La cantidad de proteínas presentes en cada una de las muestras, experimental y control, fue cuantificada mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Adicionalmente, se realizó una evaluación electroforética 1D para confirmar la integridad de los extractos proteicos de las muestras control y experimental (**Figura 5**), al respecto, la cantidad promedio de proteínas presentes en el grupo control fue de 3.32  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , mientras que en el grupo experimental se cuantificaron 4.14  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

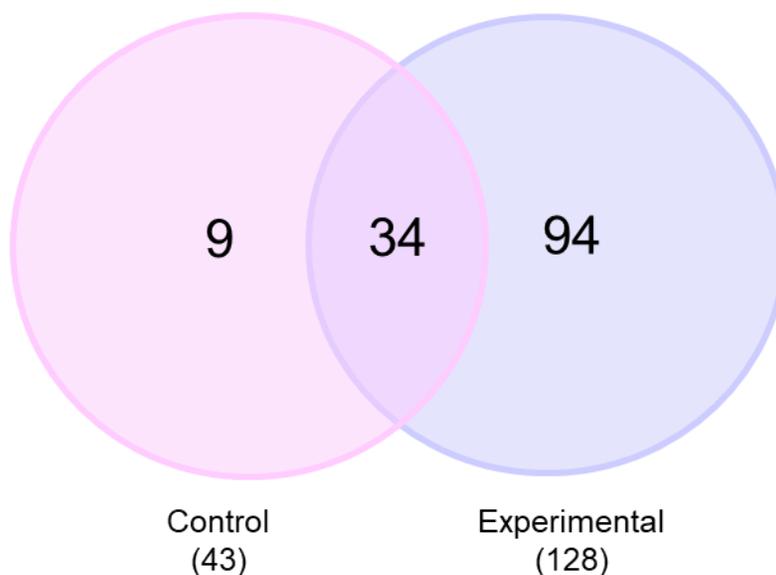


**Figura 5.** La imagen muestra el patrón electroforético obtenido como resultados de la separación en 1D SDS-PAGE de los extractos proteicos experimental y control. 4  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras fueron cargados en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida de una dimensión con un estándar de marcador molecular como referencia de peso molecular (carril 1) y 1  $\mu\text{g}$  de lisozima como referencia de cantidad (carril 4).

En general en el carril 3, el cual corresponde a la muestra experimental, se logra observar una mayor expresión de proteínas con respecto a la muestra control (carril 2), las bandas en el carril 3 se muestran visiblemente más gruesas con respecto a las del carril control. También, es posible observar que tanto para el grupo control como el experimental, la mayoría de las bandas de proteínas se encuentran agrupadas en el intervalo de peso molecular de 15 – 75 kDa, en dicho intervalo es posible identificar más de 26 bandas.

### 9.2.2 Identificación proteica.

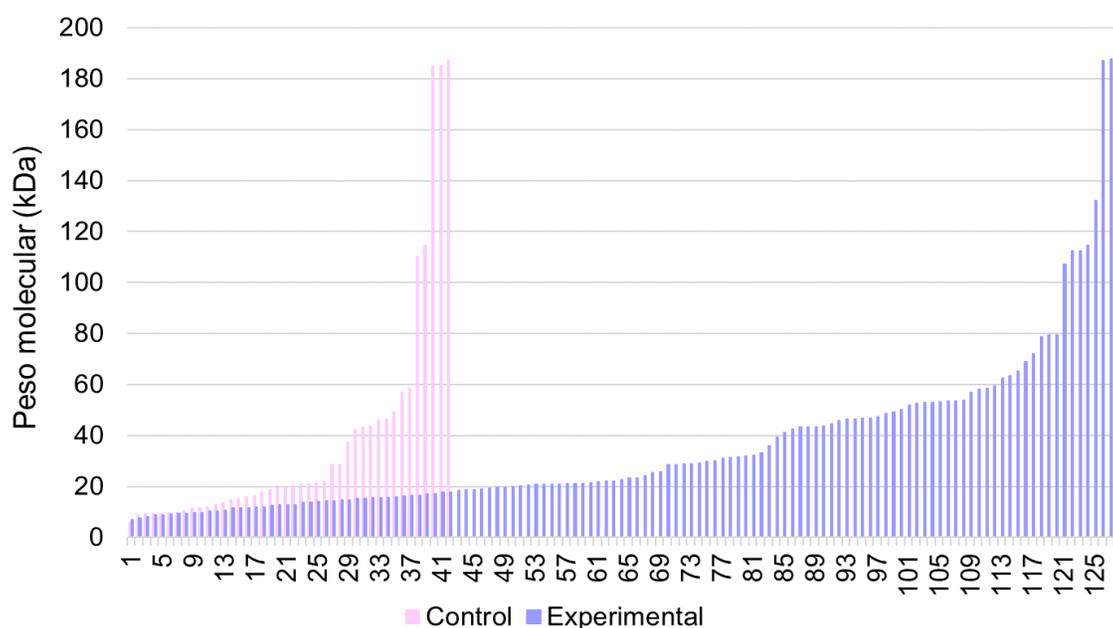
A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de la identificación por Espectrometría de Masas (MS) de los perfiles proteicos diferencialmente expresados en las muestras control y experimental. La **Figura 6** muestra un diagrama de Venn en el que se ilustran las relaciones cuantitativas de las proteínas diferencialmente expresadas en los grupos evaluados.



**Figura 6.** Diagrama de Venn. Se muestra la cantidad de proteínas identificadas en el grupo control y experimental, tanto las proteínas identificadas en común (grupo control y experimental).

En total se identificaron 137 diferentes proteínas, distribuidas de la siguiente manera: en el grupo control se identificaron 43 proteínas, de las cuales 9 proteínas fueron identificadas exclusivamente en dicho grupo. En el grupo experimental (células bacterianas tratadas con clorhexidina al 0.20 %) se cuantificaron 128 proteínas, de las cuales 94 diferentes proteínas fueron únicas en dicho grupo. Finalmente, 34 proteínas fueron identificadas tanto en el grupo control como en el grupo experimental.

El total de las proteínas identificadas fueron organizadas con base en su peso molecular (kDa) como se muestra en la **figura 7**.



**Figura 7.** Gráfica que muestra la relación en el peso molecular (kDa) entre las proteínas diferencialmente identificadas en los grupos control y experimental.

Como se puede observar en la gráfica anterior, tanto para el grupo control como para el experimental, la proteína más grande identificada tuvo un peso molecular mayor de ~180 kDa. Mientras que en la identificación de la proteína más pequeña en los grupos evaluados existieron marcadas diferencias, en el grupo control la proteína más pequeña

identificada tuvo un peso molecular de ~50 kDa, mientras que en el grupo experimental la proteína más pequeña tuvo un peso molecular de ~6 kDa.

En la **Tabla 2** se enlistan las 9 proteínas exclusivamente identificadas en el grupo control organizadas con base en abundancia, en la **Tabla 3** las 93 proteínas exclusivamente identificadas en el grupo experimental, mientras que la **Tabla 4** muestra las 34 proteínas identificadas en ambos grupos.

**Tabla 2. Proteínas identificadas sólo en el grupo control.**

	<b>Acceso</b>	<b>Nombre</b>	<b>MW (kDa)</b>
1	Q51816_PORGN	Arg gingipain 1 proteinase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 PE 3 SV 1	185,319
2	A0A0K2J6P1_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> AJW4 OX 1403336 GN PGJ 00016580 PE 3 SV 1	184,752
3	A0A212G9N0_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 05510 PE 4 SV 1	9,408
4	A0A212G7L4_PORGN	50S ribosomal protein L31 type B OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rpmE2 PE 3 SV 1	9,792
5	PRTH_PORGI	Protease PrtH OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC BAA 308 W83 OX 242619 GN prtH PE 3 SV 1	110,167
6	Q9RHI2_PORGN	Elongation factor Tu OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN ef tu PE 3 SV 1	43,627
7	A0A212GAZ4_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 03540 PE 4 SV 1	5,544
8	T2NDG7_PORGN	Cleaved adhesin domain protein Fragment OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> JCVI SC001 OX 1195243 GN A343	37,058
9	A0A1D3UQ75_TANFO	Bacterial Ig like domain Group 2 OS <i>Tannerella forsythia</i> OX 28112 GN CLI86 03375 PE 4 SV 1	58,447

**Tabla 3. Proteínas identificadas sólo en el grupo experimental.**

Acceso		Nombre	mW (kDa)
1	A0A2D2N767_PORGN	Peptidase C25 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 00255 PE 3 SV 1	187,797
2	KGP83_PORGN	Lys gingipain W83 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN kgp PE 1 SV 1	187,756
3	A0A2D2P334_PORGN	Peptidoglycan domain protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 09925 PE 4 SV 1	21,914
4	A0A212G636_PORGN	Co chaperonin GroES OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN groES PE 3 SV 1	14,123
5	B2RH30_PORG3	OMP b brl 2 domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 C	24,347
6	A0A212G9N0_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 05510 PE 4 SV 1	9,408
7	A0A212G7L4_PORGN	50S ribosomal protein L31 type B OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rpmE2 PE 3 SV 1	9,792
8	A0A212GB59_PORGN	50S ribosomal protein L24 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rplX PE 3 SV 1	11,594
9	A0A0E2LNN4_PORGN	Putative DNA binding protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> F0570 OX 1227271 GN HMPREF1555 01948 PE 4 S	18,238
10	A0A212G715_PORGN	DNA binding protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 08830 PE 3 SV 1	10,292
11	B2RK03_PORG3	Phosphate acetyltransferase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	35,805
12	A0A212G8A3_PORGN	Ferredoxin OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 07585 PE 4 SV 1	8,178
13	B2RHY8_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	112,340
14	A0A1R4DUR8_PORGN	Malate dehydrogenase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN mdh PE 3 SV 1	47,206
15	Q9RHI0_PORGN	Elongation factor Tu OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN ef tu PE 3 SV 1	43,641
16	A0A212G8U9_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 06605 PE 4 SV 1	52,097
17	B2RMC1_PORG3	Immunoreactive 23 kDa antigen OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 10368	22,588
18	A0A212G4Z6_PORGN	Multifunctional fusion protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN secD PE 3 SV 1	107,152
19	A0A212G9U6_PORGN	2 3 bisphosphoglycerate dependent phosphoglycerate mutase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 12975	28,718
20	A0A212G713_PORGN	Serine hydroxymethyltransferase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN glyA PE 3 SV 1	46,643
21	B2RK30_PORG3	Bifunctional protein FoID OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	31,941
22	B2RIG1_PORG3	Putative heat shock related protease htrA protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 D	52,802
23	A0A212G1A0_PORGN	Phosphate acetyltransferase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN SJDPG5 03550 PE 4 SV 1	43,248
24	A0A212GC03_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 02550 PE 4 SV 1	62,473
25	A0A212G7N1_PORGN	Indolepyruvate oxidoreductase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 02150 PE 4 SV	21,066
26	DNAK_PORG3	Chaperone protein DnaK OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM	69,001
27	A0A829KLT7_PORGN	Tetratricopeptide repeat protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> F0569 OX 1227270 GN HMPREF1554 01857 PE	112,294
28	B2RLH8_PORG3	3 oxoacyl acyl carrier protein synthase 2 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 207	44,491
29	A0A212GC43_PORGN	50S ribosomal protein L11 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rplK PE 3 SV 1	15,597
30	A0A212GA93_PORGN	zf RING 7 domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 04640 PE	28,770
31	B2RGV7_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	52,777
32	PCKA_PORG3	Phosphoenolpyruvate carboxykinase ATP OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709	59,382
33	B2RIW2_PORG3	Peptidyl dipeptidase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 1	79,490
34	B2RM28_PORG3	Hemagglutinin protein HagB OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	39,371
35	B2RI40_PORG3	Putative DnaK suppressor protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 10	14,318
36	B2RHC5_PORG3	Malonyl CoA acyl carrier protein transacylase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 2	31,489
37	A0A134DNY2_PORGN	RNA polymerase Rpb6 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 05395 PE 4 SV 1	12,934
38	A0A212GB83_PORGN	50S ribosomal protein L29 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rpmC PE 3 SV 1	7,480
39	B2RII4_PORG3	Alkyl hydroperoxide reductase C OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103	21,063

40	A0A1D3UME7_TANFO	50S ribosomal protein L3 OS <i>Tannerella forsythia</i> OX 28112 GN rplC PE 3 SV 1	21,992
41	B2RKY4_PORG3	Putative peptidyl prolyl cis trans isomerase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20	79,442
42	B2RIX5_PORG3	Probable electron transfer flavoprotein beta subunit OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277	30,947
43	B2RLR5_PORG3	Flavodoxin OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 12257 NCT	17,184
44	B2RHH5_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	18,797
45	A0A212G7Q7_PORGN	NADP oxidoreductase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 08370 PE 4 SV 1	41,273
46	A0A134DRV6_PORGN	30S ribosomal protein S2 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN rpsB PE 3 SV 1	31,390
47	B2RJR5_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	23,215
48	A0A212G7R1_PORGN	50S ribosomal protein L9 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rplI PE 3 SV 1	19,420
49	B2RH02_PORG3	Immunoreactive 53 kDa antigen OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 10368	53,560
50	A0A2A6EIW8_PREIN	Uncharacterized protein OS <i>Prevotella intermedia</i> OX 28131 GN CLI71 00430 PE 4 SV 1	52,598
51	A0A212GAQ3_PORGN	30S ribosomal protein S16 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rpsP PE 3 SV 1	20,688
52	B2RLM9_PORG3	Putative 2 oxoglutarate oxidoreductase beta subunit OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277	25,396
53	A0A212G644_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 09680 PE 4 SV 1	23,287
54	A0A212GAW2_PORGN	Aminopeptidase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 03685 PE 3 SV 1	53,073
55	A0A134DPL6_PORGN	Aspartyl tRNA amidotransferase subunit B OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 08555 PE 4 SV 1	16,386
56	A0A212FQU6_PORGN	Adenylosuccinate synthetase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN purA PE 3 SV 1	46,534
57	B2RHL9_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	32,075
58	B2RJL1_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	15,537
59	A0A134DR96_PORGN	50S ribosomal protein L18 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN rplR PE 3 SV 1	12,555
60	A0A212GB65_PORGN	30S ribosomal protein S12 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rpsL PE 3 SV 1	14,760
61	B2RIN4_PORG3	Indolepyruvate oxidoreductase subunit IorA OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 2070	58,321
62	A0A1D3UKP3_TANFO	Ribosome recycling factor OS <i>Tannerella forsythia</i> OX 28112 GN frr PE 3 SV 1	20,838
63	A0A2A6E8G4_TANFO	Serine hydroxymethyltransferase OS <i>Tannerella forsythia</i> OX 28112 GN glyA PE 3 SV 1	46,575
64	A0A134DPN1_PORGN	30S ribosomal protein S18 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN rpsR PE 3 SV 1	10,614
65	A0A0K2J4B1_PORGN	Glutamate dehydrogenase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> AJW4 OX 1403336 GN PGJ 00006400 PE 3 SV 1	48,436
66	B2RJC6_PORG3	Carboxyl terminal processing protease OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 C	63,482
67	A0A212G3Y8_PORGN	50S ribosomal protein L30 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN rpmD PE 3 SV 1	6,812
68	A0A212GC72_PORGN	Elongation factor Ts OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN tsf PE 3 SV 1	30,139
69	B2RHU8_PORG3	Putative HIT family protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	14,336
70	B2RIY3_PORG3	Putative TonB protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM	25,770
71	A0A2D2N416_PORGN	OmpA like domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 00810 PE 4 SV 1	53,545
72	A0A1D3ULR7_TANFO	Chaperone protein Skp OS <i>Tannerella forsythia</i> OX 28112 GN skp 1 PE 3 SV 1	19,769
73	B2RLA4_PORG3	Transcription termination factor Rho OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CI	72,109
74	A0A212G7Z3_PORGN	Chaperonin GroEL OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN groEL PE 3 SV 1	58,103
75	A0A134DRQ5_PORGN	50S ribosomal protein L21 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN rplU PE 3 SV 1	11,815
76	A0A212G8S7_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 07000 PE 4 SV 1	20,632
77	A0A212GA95_PORGN	4 hydroxybutyryl CoA dehydratase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 04940 PE 4	53,957
78	B2RJW7_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	16,374

79	B2RGP7_PORG3	Por secretion system protein porV Pg27 lptO OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM	43,239
80	A0A212G971_PORGN	Polyketide cyclase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 06215 PE 4 SV 1	15,324
81	A0A134DQ06_PORGN	Glycine cleavage system H protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN gcvH PE 3 SV 1	13,800
82	A0A212GBE8_PORGN	50S ribosomal protein L15 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rplO PE 3 SV 1	15,580
83	B2RKE5_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	50,049
84	B2RJY8_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	29,705
85	A0A134DQE1_PORGN	Aspartate 1 decarboxylase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN panD PE 3 SV 1	12,876
86	B2RK80_PORG3	S4 domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	17,586
87	Q7MVY9_PORGI	Bacterioferritin comigratory protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC BAA 308 W83 OX 2426	19,084
88	A0A212G330_PORGN	Elongation factor P OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN efp PE 3 SV 1	21,165
89	A0A212G6L3_PORGN	Histidinol phosphate aminotransferase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN SJDPG5 09285 PE	17,006
90	A0A212GAB7_PORGN	Peptidyl prolyl cis trans isomerase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 05010 PE	29,002
91	T2NB07_PORGN	Tetratricopeptide repeat protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> JCVI SC001 OX 1195243 GN A343 1665 PE 4	132,239
92	A0A212G799_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN SJDPG5 09090 PE 4 SV 1	65,326
93	B2RLA7_PORG3	Glutamate formimidoyltransferase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 10	33,143
94	A0A2D2N4K1_PORGN	Peptidase M13 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 01885 PE 3 SV 1	78,802

**Tabla 4. Proteínas identificadas en ambos grupos, control y experimental.**

Acceso		Nombre	mW (kDa)
1	KGP_PORG3	Lys gingipain OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 12257	187,143
2	B2RI88_PORG3	Superoxide dismutase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 1	21,487
3	B2RHA9_PORG3	DNA binding protein HU OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM	9,472
4	B2RL53_PORG3	Putative site specific recombinase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP	46,356
5	B2RIQ2_PORG3	Outer membrane protein 40 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	42,407
6	B2RMB8_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	10,374
7	A0A212GCC1_PORGN	50S ribosomal protein L7 L12 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rplL PE 3 SV 1	12,678
8	B2RGZ4_PORG3	Thioredoxin domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 C	17,706
9	B2RGQ7_PORG3	Thioredoxin OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 12257 NC	11,424
10	A0A212G0V8_PORGN	Ribosome recycling factor OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD5 OX 1297565 GN frf PE 3 SV 1	20,772
11	B2RHG7_PORG3	Receptor antigen A OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 122	114,441
12	Q7MWI3_PORGI	RNA binding protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC BAA 308 W83 OX 242619 GN PG 0627 PE	11,493
13	B2RKW2_PORG3	DUF5606 domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 1	16,250
14	A0A212G987_PORGN	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 01575 PE 4 SV 1	8,707
15	A0A134DMK3_PORGN	Acyl carrier protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN acpP PE 3 SV 1	8,779
16	B2RHG8_PORG3	Receptor antigen B OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 122	56,866
17	B2RHM3_PORG3	Upregulated in stationary phase protein A OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709	9,189
18	A0A212G7Z9_PORGN	Co chaperonin GroES OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN groES PE 3 SV 1	9,636

19	B2RI27_PORG3	Putative biotin carboxyl carrier protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709	15,285
20	A0A134DQU1_PORGN	Membrane protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN ompH 1 PE 3 SV 1	19,654
21	B2RIR7_PORG3	Peptidyl prolyl cis trans isomerase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP	28,428
22	A0A134DNY8_PORGN	DUF3467 domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN CS548 05385 PE 4 SV 1	11,848
23	A0A212G9M3_PORGN	VOC domain containing protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 05705 PE 3 SV	14,752
24	A0A212GB86_PORGN	50S ribosomal protein L3 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN rplC PE 3 SV 1	20,880
25	B2RIQ3_PORG3	Outer membrane protein 41 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683	43,363
26	A0A212G983_PORGN	Cell division protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12 06175 PE 4 SV 1	18,682
27	A0A1R4DT75_PORGN	Protein TonB OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN PGIN 13 1 00011 PE 3 SV 1	49,040
28	A0A212G8M5_PORGN	Protein GrpE OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN grpE PE 3 SV 1	21,750
29	B2RHR2_PORG3	Thiol peroxidase OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 12257	19,148
30	A0A134DPK6_PORGN	30S ribosomal protein S6 OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> OX 837 GN rpsF PE 3 SV 1	13,585
31	A0A212G879_PORGN	2 oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit gamma OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567	20,126
32	B2RH12_PORG3	Uncharacterized protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JC	15,730
33	B2RJ50_PORG3	TPR domain protein OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain ATCC 33277 DSM 20709 CIP 103683 JCM 122	45,782
34	A0A212G9K0_PORGN	Electron transfer flavoprotein subunit beta OS <i>Porphyromonas gingivalis</i> SJD12 OX 1297567 GN SJDPG12	28,532

## 10. DISCUSIÓN.

El presente proyecto de investigación fue planteado con el objetivo de evaluar los cambios en el proteoma de *P. gingivalis* después de estar expuesta a CHX al 0.20% por un periodo corto de tiempo, un minuto. Diversos estudios publicados han demostrado la efectividad que tiene la clorhexidina (CHX) para el control del crecimiento de las biopelículas orales, y en especial su capacidad inhibitoria sobre *Porphyromonas gingivalis*. Se sabe que la CHX al 0.20% inhibe componentes estructurales importantes de *P. gingivalis*, como membrana celular, adhesinas, etc. sin embargo, su efecto en la expresión proteica de *P. gingivalis* no ha sido estudiado.

En el presente estudio se confirmó el efecto inhibitorio de clorhexidina al 0.20% sobre *Porphyromonas gingivalis*, observándose que con una exposición de 1 minuto a CHX al 0.20% una inhibición microbiana de 93% es alcanzada, este resultado coincide con un reporte previo que mostró que en condiciones *in vivo* la utilización de un colutorio de CHX al 0.20% es capaz de inducir una inhibición del crecimiento microbiano en la flora salival, este ensayo obtuvo como resultado que tras utilizar CHX al 0.20% como enjuague bucal durante 30 segundos redujo el porcentaje de bacterias vivas en un 90 – 93% [38]. Además, otro estudio reportó que al realizarse un enjuague bucal con CHX al 0.20% al día por 1 minuto dan como resultado una reducción significativa del total de la microbiota salival. También reporta que al realizarse dos enjuagues bucales con CHX al 0.20% al día por 1 minuto se obtuvo una reducción del número de bacterias con una significancia de  $p < 0.02$  [39].

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo derivados de la identificación proteica, se observó que la proteína de mayor peso molecular identificada en el grupo control y experimental es la gingipaina de lisina, a la cual está asociada a la actividad proteolítica extracelular de *P. gingivalis* [40]. Las gingipainas constituyen un grupo de endopeptidasas de cisteína que son responsables de al menos 85% de la

actividad proteolítica general, y del 100% de la llamada “actividad similar a la tripsina” producidas por *P. gingivalis* [41]. La gingipaina de lisina esta codificada por el gen *kgp*. Las gingipainas tienen la capacidad de unirse a los glóbulos rojos y a proteínas que contengan hemo, incluida la hemoglobina, estas proteasas actúan como una enzima hemolítica para producir y almacenar hierro, el cual es un factor esencial de crecimiento, supervivencia y función de *P. gingivalis* [42]. El papel esencial que desempeñan las gingipainas en la supervivencia de *P. gingivalis* explica el hallazgo del incremento en su expresión observado en el presente trabajo.

En el presente trabajo se identificó en el grupo control la expresión de la proteasa PrtH la cual normalmente se encuentra en las vesículas de la membrana producidas por *P. gingivalis*, y tiene la capacidad de adherirse a la proteína del complemento C3 bajo condiciones definidas [43].

Superóxido dismutasa (sod), enzima que fue detectada tanto en el grupo control como en el experimental, cataliza la dismutación del superóxido y es considerada importante para la protección de las células contra el anión superóxido tóxico, este hallazgo es importante dado que se ha identificado que la expresión de esta enzima incrementa hasta 3 veces cuando *P. gingivalis* es expuesta a estímulos como el incremento de temperatura (de 37 a 39°C), al respecto, en el presente trabajo de investigación se identificó un incremento mayor a dos veces en las células bacterianas que fueron expuestas a CHX, grupo experimental, con respecto al grupo control [40].

Previamente se ha reportado que la respuesta al choque térmico es altamente conservada tanto en células eucariotas y procariotas, y está agrupada en dos principales familias de proteínas chaperonas moleculares, *DnaK* (HSP70) y *GroEL* (HSP60), las cuales participan en el plegamiento, oligomerización, translocación y degradación de proteínas [40, 44]. En el presente trabajo de investigación se identificó la expresión de las chaperonas *GroES*, *GroEL* y *DnaK* en grupo experimental, dado la función protectora que

tienen dichas proteínas, su identificación en el grupo de bacterias que fueron expuestas a CHX 0.20% fue hallazgo esperado. Otro hallazgo relevante fue el incremento de 4.8 veces en la expresión de la chaperona *GroES* en el grupo experimental con el respecto al control, este hallazgo indicaría que la exposición de *P. gingivalis* a CHX al 0.20% por un periodo corto de tiempo (1 min) es capaz de inducir la desnaturalización de las proteínas celulares bacterianas y el incremento en la expresión de esta chaperona reflejaría un intento de contrarrestar dicha desnaturalización por medio del replegamiento de las proteínas afectadas [40, 45].

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación aportan información novedosa referente a los mecanismos de acción que subyacen el efecto inhibitorio de CHX al 0.20% sobre *P. gingivalis*.

## **11. CONCLUSIONES.**

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se confirmó el efecto inhibitorio *in vitro* de clorhexidina al 0.20% sobre *P. gingivalis* en estado planctónico. Además, fue posible identificar que los cambios en el proteoma de *Porphyromonas gingivalis* tras su exposición a CHX al 0.20% resultó en un incremento aproximado de 2.9 veces la expresión proteica.

Además, los resultados derivados de la identificación proteica indicarían que la respuesta de *P. gingivalis* a la exposición de CHX al 0.20% está caracterizada por un incremento aproximado de 2.6 veces en la expresión de la proteasa gingipaina de lisina, esta proteasa es considerada el principal factor de virulencia asociado con esta especie bacteriana. Por otro lado, el incremento aproximado de 4.8 veces en la expresión de la chaperona *GroES* indicaría que uno de los mecanismos de acción de la CHX sobre *P. gingivalis* es mediante la desnaturalización de las proteínas bacterianas.

## 12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Cruz Quintana, S.M., et al., *Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal*. Revista Cubana de Estomatología, 2017. **54**(1): p. 84-99.
2. David Herrera, J.M., Stefan Renvert and Lijian Jin, *White Paper on Prevention and Management of Periodontal Diseases for Oral Health and General Health*. 2018, FDI World Dental Federation: Ginebra.
3. Zimmermann, R., et al., *Impact of oral astringent stimuli on surface charge and morphology of the protein-rich pellicle at the tooth-saliva interphase*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019. **174**: p. 451-458.
4. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Periodontal microbial ecology*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 135-87.
5. Verma, D., P.K. Garg, and A.K. Dubey, *Insights into the human oral microbiome*. Arch Microbiol, 2018. **200**(4): p. 525-540.
6. Bik, E.M., et al., *Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals*. Isme j, 2010. **4**(8): p. 962-74.
7. Kazor, C.E., et al., *Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 558-63.
8. Güth-Thiel, S., et al., *Comprehensive measurements of salivary pellicle thickness formed at different intraoral sites on Si wafers and bovine enamel*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019. **174**: p. 246-251.
9. Rabin, N., et al., *Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents*. Future Med Chem, 2015. **7**(4): p. 493-512.
10. Gibbons, R.J., et al., *Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces*. Arch Oral Biol, 1990. **35 Suppl**: p. 107S-114S.
11. Hernández-Jiménez, E., et al., *Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: which do human macrophages prefer?* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(4): p. 947-52.
12. Nazar C, J., *Biofilms bacterianos*. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, 2007. **67**: p. 161-172.
13. Papapanou, P.N., et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S173-S182.
14. Trombelli, L., et al., *Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S46-S73.
15. Haffajee, A.D., et al., *Microbial complexes in supragingival plaque*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(3): p. 196-205.
16. Mysak, J., et al., *Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 476068.
17. Reyes, L., *Porphyromonas gingivalis*. Trends Microbiol, 2021. **29**(4): p. 376-377.
18. Lunar Silva, I. and E. Cascales, *Molecular Strategies Underlying Porphyromonas gingivalis Virulence*. J Mol Biol, 2021. **433**(7): p. 166836.
19. Enersen, M., K. Nakano, and A. Amano, *Porphyromonas gingivalis fimbriae*. J Oral Microbiol, 2013. **5**.
20. Díaz Zúñiga, J., et al., *Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis*. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral, 2012. **5**(1): p. 40-45.

21. Nonaka, S. and H. Nakanishi, *Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2*. Neurochemistry International, 2020. **140**: p. 104840.
22. Han, N., J. Whitlock, and A. Progulsk-Fox, *The hemagglutinin gene A (hagA) of Porphyromonas gingivalis 381 contains four large, contiguous, direct repeats*. Infect Immun, 1996. **64**(10): p. 4000-7.
23. Houari, A. and P. Di Martino, *Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation*. Lett Appl Microbiol, 2007. **45**(6): p. 652-6.
24. Hope, C.K. and M. Wilson, *Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(5): p. 1461-8.
25. Loe, H., E. Theilade, and S.B. Jensen, *Experimental Gingivitis in Man*. J Periodontol (1930), 1965. **36**: p. 177-87.
26. Vyas, T., et al., *Chemical plaque control - A brief review*. J Family Med Prim Care, 2021. **10**(4): p. 1562-1568.
27. Flemmig, T.F. and T. Beikler, *Control of oral biofilms*. Periodontol 2000, 2011. **55**(1): p. 9-15.
28. Serrano, J., et al., *Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis*. J Clin Periodontol, 2015. **42 Suppl 16**: p. S106-38.
29. James, P., et al., *Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **3**(3): p. Cd008676.
30. Teles, R.P. and F.R. Teles, *Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?* Braz Oral Res, 2009. **23 Suppl 1**: p. 39-48.
31. Van der Weijden, F.A., et al., *Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control?* Dent Clin North Am, 2015. **59**(4): p. 799-829.
32. Melville, T.H. and R.H. Birch, *Root canal and periapical floras of infected teeth*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1967. **23**(1): p. 93-98.
33. Yamaguchi, M., et al., *Porphyromonas gingivalis biofilms persist after chlorhexidine treatment*. Eur J Oral Sci, 2013. **121**(3 Pt 1): p. 162-8.
34. Cieplik, F., et al., *Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern?* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 587.
35. Martinez-Hernandez, M., B. Reda, and M. Hannig, *Chlorhexidine rinsing inhibits biofilm formation and causes biofilm disruption on dental enamel in situ*. Clin Oral Investig, 2020. **24**(11): p. 3843-3853.
36. Reda, B., et al., *Determination of chlorhexidine retention in different oral sites using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*. Arch Oral Biol, 2020. **110**: p. 104623.
37. Grenier, D., J. Bertrand, and D. Mayrand, *Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine*. Oral Microbiol Immunol, 1995. **10**(5): p. 319-20.
38. Cousido, M.C., et al., *In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria*. Clin Oral Investig, 2010. **14**(4): p. 397-402.
39. Dahlen, G., *Effect of antimicrobial mouthrinses on salivary microflora in healthy subjects*. Scand J Dent Res, 1984. **92**(1): p. 38-42.
40. Olsen, I., H.N. Shah, and S.E. Gharbia, *Taxonomy and biochemical characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000, 1999. **20**: p. 14-52.
41. Imamura, T., *The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease*. J Periodontol, 2003. **74**(1): p. 111-8.

42. Yongqing, T., et al., *The lysine-specific gingipain of Porphyromonas gingivalis : importance to pathogenicity and potential strategies for inhibition*. Adv Exp Med Biol, 2011. **712**: p. 15-29.
43. Fletcher, H.M., et al., *Virulence of a Porphyromonas gingivalis W83 mutant defective in the prtH gene*. Infect Immun, 1995. **63**(4): p. 1521-8.
44. Martin, J., et al., *Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 36-42.
45. Jaworek, M.W., et al., *Stability of the chaperonin system GroEL-GroES under extreme environmental conditions*. Phys Chem Chem Phys, 2020. **22**(6): p. 3734-3743.