

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**Estudio de la expresión diferencial de proteínas  
de *Porphyromonas gingivales* en biofilm vs. en  
estado planctónico**

Tutor: Profesor Doctor Mariano Sanz

Diogo Banaco





**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**  
**VISTO BUENO DEL TUTOR**  
**MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**El profesor/a tutor**

Nombre y apellidos:

Mariano Sanz Alonso

**del alumno/a**

Nombre y apellidos

Diogo Fernandes Banaco

**encuadrado en la línea de investigación**

- Etiología y Patogenia de las enfermedades periodontales

**DA EL VISTO BUENO**

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

“Estudio de la expresión diferencial de proteínas de *Porphyromonas gingivales* en biofilm vs. en estado planctónico”

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 31 de Julio de 2019.

Fdo: el profesor/a

Mariano Sanz Alonso

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel





## **MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

### **COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)**

**CENTRO:** Facultad de Odontología

**ESTUDIANTE DE MÁSTER:** Diogo Fernandes Banaco

**TUTOR/ES DEL TFM:** Mariano Sanz Alonso

**TÍTULO DEL TFM:** “Estudio de la expresión diferencial de proteínas de Porphyromonas gingivales en biofilm vs. en estado planctónico”

**FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA:** 24/07/2017

**FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA** (en caso de producirse): 12/09/2018

#### **1. Objeto**

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

#### **2. Colaboración mutua**

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con

los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

### **3. Normativa**

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

### **4. Obligaciones del estudiante de Máster**

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

### **5. Obligaciones del tutor/es del TFM**

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

### **6. Buenas prácticas**

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en

el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

## **7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos**

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster. En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

## **8. Confidencialidad**

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

## **9. Propiedad intelectual e industrial**

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

## **10. Periodo de Vigencia**

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

**Firmado en Madrid, a 31 de julio de 2019**

<p>El estudiante de Máster</p>          <p>Fdo.: Diogo Fernandes Banaco</p>	<p>El Tutor/es</p>    <p>Fdo.: Mariano Sanz Alonso</p>
---	--

**SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

## ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Diogo Fernandes Banaco con NIF 14100255, estudiante de Máster en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2018 -2019 , como autor/a del trabajo de fin de máster titulado “Estudio de la expresión diferencial de proteínas de Porphyromonas gingivales en biofilm vs. en estado planctónico” y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/es/son:

Mariano Sanz Alonso

---

### DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente.

De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 31 de julio de 2019

Fdo.: Diogo Fernandes Banaco



# Índice

Resumen .....	1
1. Introducción .....	4
2. Objetivos.....	13
3. Material y Métodos.....	14
3.1. Cultivo y cepa bacteriana .....	14
3.2. Formación del biofilm monoespecie de <i>P. gingivalis</i> .....	14
3.3. Recuperación de las bacterias presentes en el biofilm y en el cultivo planctónico.....	15
3.4. Extracción y solubilización de las proteínas bacterianas .....	15
3.5. Cuantificación de proteínas .....	16
3.6. Digestión de las proteínas .....	16
3.7. Experimento Label Free .....	17
3.8. Identificación de Proteínas .....	18
3.9. Cuantificación relativa de las proteínas mediante el software Proteome Discoverer 2.2 .....	19
4. Resultados .....	22
4.1. Desarrollo del biofilm y cultivo planctónico .....	22
4.2. Estudio de la expresión diferencial.....	22
4.3. Experimento Label Free .....	24
5. Discusión.....	29
6. Conclusión .....	34
7. Agradecimientos .....	36
8. Bibliografía .....	38

## Resumen

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión diferencial de proteínas de *Porphyromonas gingivalis* cuando está formando biofilm respecto a cuando está en estado planctónico.

**Materiales y Métodos:** A partir de un cultivo en medio BHI modificado de *P. gingivalis* ATCC33277 en fase exponencial se desarrolló el biofilm monoespecie sobre discos estériles de hidroxapatita en una placa multipocillo de 24 pocillos. El cultivo planctónico se desarrolló en viales de plástico de 50 mL tipo Falcón. En ambos casos se ajustó la concentración bacteriana a  $10^7$  unidades formadoras de colonias (ufc)/mL y se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 96 horas (3 réplicas biológicas de cada una de las condiciones). Para recuperar las bacterias del biofilm se extrajo el disco, se añadió 1 mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*), se vorteoó durante 3 minutos recogiendo la suspensión, añadiéndola a un eppendorf y centrifugando a 13000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Para recuperar las bacterias en estado planctónico, se centrifugó la suspensión bacteriana a 9000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió a la extracción de proteínas en ambos casos. Para ello se siguieron los siguientes pasos: 1) los precipitados se re-suspendieron en PBS junto con inhibidores de proteasas para lisar las células bacterianas con un sonicador de punta, 2) las muestras se limpiaron para eliminar posibles restos de sales, detergentes, lípidos e impurezas, 3) las proteínas se solubilizaron en urea 8M mediante vortex y utilizando un sonicador de baño, y 4) se cuantificaron empleando el método de Bradford y el fluorímetro Qubit 3.0. Para comprobar la cuantificación proteica se realizó un gel de control de carga (SDS-PAGE 10%). El estudio de expresión diferencial se realizó sin marcaje proteico ni peptídico acoplado a un espectrómetro de masas (Label-Free (LC-MS/MS)).

**Resultados:** Se pudieron cuantificar un total de 614 proteínas, de las cuales 73 se expresaban diferencialmente en las condiciones de crecimiento. De estas proteínas diferenciales, 28 se sobre-expresaban cuando la bacteria estaba formando biofilm y 45 proteínas se reprimían en este modo de crecimiento.

**Conclusión:** *P. gingivalis* presentó expresión diferencial de diversas proteínas en el estado de biofilm en relación al estado planctónico. Estas proteínas que se expresan diferencialmente en el biofilm pueden ser buenas candidatas para su empleo en el diagnóstico y tratamiento de la periodontitis.



# 1. Introducción

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria, multifactorial asociada a la presencia de un biofilm bacteriano disbiótico y se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar). Sus manifestaciones primarias incluyen la pérdida de inserción clínica, la reabsorción del hueso alveolar, la presencia de bolsas periodontales y el sangrado gingival (1). La formación de un biofilm bacteriano inicia la inflamación gingival, pero, sin embargo, la iniciación y progresión de la periodontitis depende de alteraciones que lleven a la disbiosis del microbioma (2).

Esta patología es uno de los mayores problemas de salud pública debido a su elevada prevalencia y porque en última instancia lleva a la pérdida del diente que, por su vez, afecta negativamente la función masticatoria y la estética y puede conllevar a una disminución de la calidad de vida. Frencken y col. reportan que, en 2010, la periodontitis era la sexta enfermedad más frecuente en el mundo y que afectaba 10,8% o 743 millones de personas de 15 a 99 años en todo el mundo. Los autores también refieren que la prevalencia y la incidencia de la periodontitis son dependientes de la edad y que existe una marcada variación geográfica (3).

En la naturaleza, las células bacterianas pueden crecer en estado planctónico o formando un biofilm. Costerton y col. han definido el biofilm como poblaciones bacterianas que se encuentran soportadas por una matriz extracelular de polisacáridos, adheridas entre sí y/o a superficies (4, 5). En la cavidad oral, los microorganismos crecen preferencialmente adheridos a superficies formando biofilms tridimensionales. La cavidad oral es el único local del cuerpo humano que presenta superficies que no sufren descamación, como los dientes y las dentaduras y esto hace que los microorganismos se acumulen en grandes cantidades especialmente

en locales difíciles de alcanzar con la higiene oral. La mayoría de los biofilms están constituidos por múltiples especies. Estos microorganismos no están distribuidos al azar, sino que están espacial y funcionalmente organizados estando involucrados en una amplia variedad de interacciones físicas, metabólicas y moleculares (6) (Figura 1). Estas interacciones bacterianas proporcionan beneficios para los organismos que la componen, tales como (6-10)

- Un rango de hábitat más amplio para el crecimiento. El metabolismo de los colonizadores primarios altera las condiciones locales y así permite la colonización y el crecimiento de las especies tardías.
- Una mayor diversidad y eficiencia metabólica. Una vez que las moléculas son recalcitrantes al catabolismo por organismos individuales, pueden ser degradadas por las comunidades bacterianas.
- Una mayor resistencia al estrés ambiental, a los agentes antimicrobianos y a las defensas del huésped. Esto se debe principalmente: a la producción, por las células vecinas, de enzimas neutralizantes ( $\beta$ -lactamasa, proteasa IgA, catalasa) que protegen a los organismos susceptibles; a la transferencia horizontal de genes; y a la protección física contra la fagocitosis que las comunidades microbianas ofrecen a las células que se encuentran más profundas en el biofilm.
- Aumento en la capacidad de causar enfermedad, siendo los abscesos los mejores ejemplos de infecciones polimicrobianas en las que los organismos que individualmente no causan enfermedad pueden hacerlo cuando están presentes como un consorcio (sinergismo patogénico).

Los biofilms en la cavidad oral se forman a través de una secuencia ordenada de eventos, resultando en una biopelícula microbiana

estructuralmente y funcionalmente organizada (6, 11-13). Las distintas etapas incluyen:

1. Formación de la película adherida. Las moléculas se ligan a la superficie del diente segundos inmediatamente después de la exposición en la cavidad oral. Estas moléculas son originarias principalmente de la saliva, pero también del fluido crevicular. La película adherida altera las propiedades de la superficie influyendo en el patrón de colonización posterior (12).
2. Adhesión reversible entre la superficie de la célula microbiana y la película adherida. Esto implica interacciones físico-químicas débiles, de largo alcance, entre las moléculas en la superficie de la célula microbiana y las producidas por la película adherida.
3. Adhesión irreversible. Implica interacciones entre moléculas específicas (adhesinas) en la superficie de los colonizadores primarios (principalmente *Streptococcus*) y moléculas complementarias (receptores) presentes en la película adherida (14).
4. La co-adherencia. Los colonizadores secundarios y tardíos se adhieren mediante adhesinas a los receptores de las bacterias ya adheridas, lo que lleva a un aumento de la diversidad microbiana (sucesión microbiana) (15). *Fusobacterium nucleatum* es un microorganismo importantísimo en esta fase ya que tiene capacidad de co-adherir con todos los colonizadores primarios y tardíos y está siempre presente cuando *P. gingivalis* está presente (14).
5. La multiplicación de las células. Provoca un aumento en la biomasa y en la síntesis de exopolímeros para formar la matriz del biofilm. En los biofilms, los microorganismos están muy próximos entre sí y, consecuentemente, interactúan entre sí. Están descritas muchas interacciones metabólicas (sinérgicas y antagónicas) entre las bacterias orales como por ejemplo el desarrollo de

cadena alimentaria en el que el producto metabólico de un organismo se convierte en el nutriente principal en un segundo. Las bacterias anaerobias estrictas, como *P. gingivalis*, pueden sobrevivir en ambientes aeróbicos si se asocian y se agregan a especies que consumen oxígeno (*Neisseria*) (12).

Otro ejemplo de estas interacciones es el *quorum sensing*. Las bacterias de la placa pueden coordinar su expresión génica y comunicarse entre sí a través de pequeñas moléculas difusibles dependiendo de la densidad celular (16).

6. El desprendimiento de células unidas para promover la colonización en otros lugares.

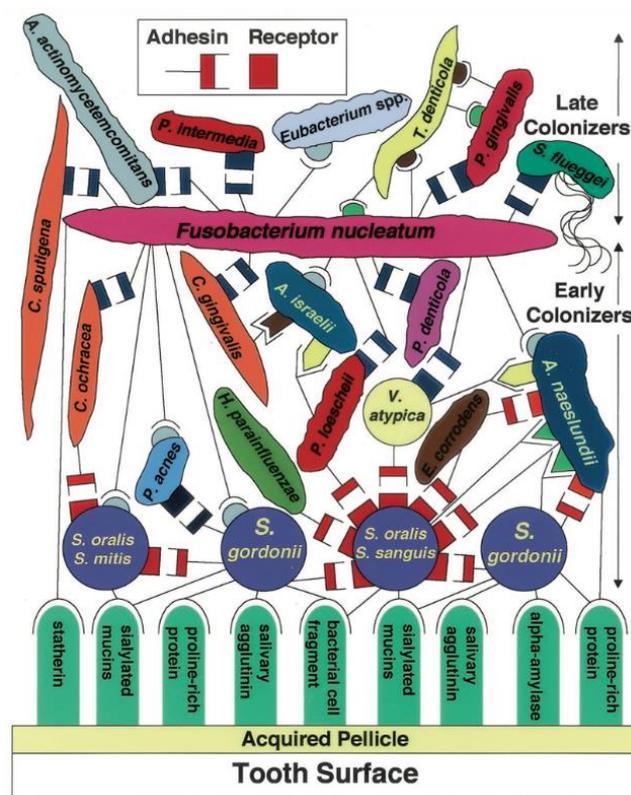


Figura 1: Modelo espacio temporal de la colonización bacteriana. Adaptado de Kolenbrander et al. 2002

El factor etiológico primario de las enfermedades periodontales es la presencia de un biofilm disbiótico. Una de las bacterias más

fuertemente asociadas con esta enfermedad es *P. gingivalis*. El Consenso Mundial en Periodoncia (17) ha designado a *P. gingivalis* como patógeno periodontal con evidencia fuerte.

*P. gingivalis* es un cocobacilo, Gram-negativo, anaerobio estricto, que mide de 1-3,5 µm. Como ya fue mencionado anteriormente esta bacteria es fuertemente asociada con la periodontitis siendo clasificada como miembro del “complejo rojo” descrito por Socransky juntamente con *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (18) (Figura 2). Varios estudios reportan una mayor prevalencia de *P. gingivalis* en sujetos enfermos en comparación con los sujetos sanos (19-21).

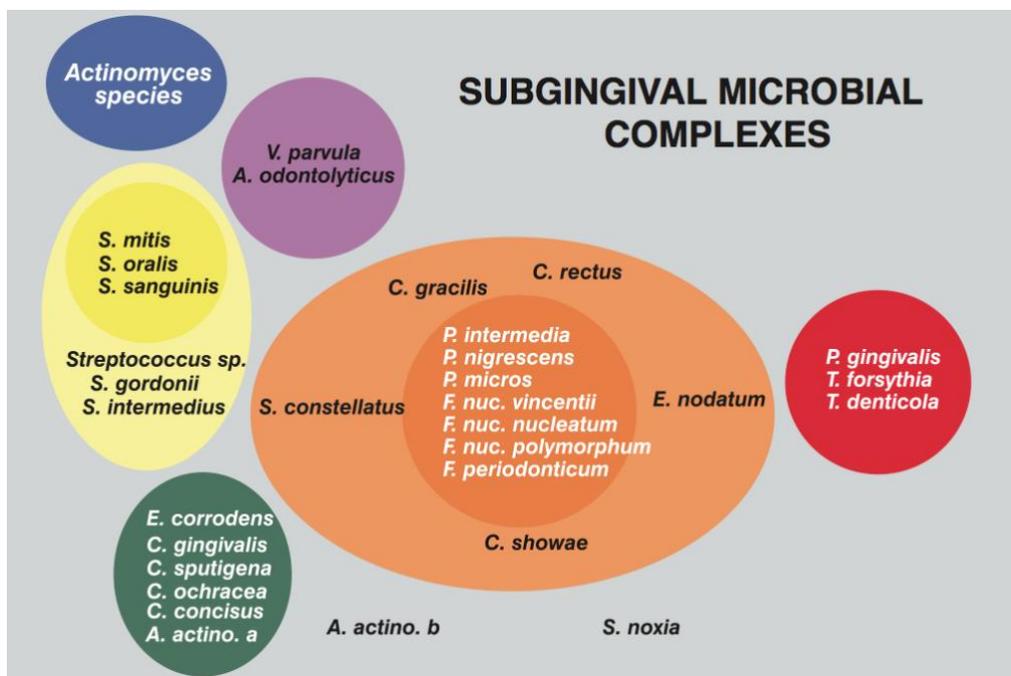


Figura 2: Complejos microbianos subgingivales descritos por Socransky y col. 1998. Adaptado de Socransky et al 1998.

Varias investigaciones, basadas en experimentos *in vitro* e *in vivo* y en el análisis de varios componentes (lipopolisacárido [LPS], proteínas de membrana y productos finales del metabolismo), identificaron un conjunto de factores de virulencia que permiten a *P. gingivalis* colonizar el tejido del huésped y provocar una respuesta inmune (22, 23). En seguida abordaremos un poco más detalladamente algunos de sus factores de virulencia.

El evento inicial en la patogenicidad de *P. gingivalis* es su adherencia en la cavidad oral. Para lograr esto, emplea varios componentes bacterianos: fimbrias, proteasas, hemaglutininas y lipopolisacáridos (22-24). Las principales fimbrias de *P. gingivalis* participan en casi todas las interacciones de este patógeno y el huésped y otras bacterias. Éstas son determinantes en la adherencia bacteriana a las superficies y a los dientes, así como en la agregación bacteriana. Son los principales determinantes adhesivos en la superficie celular de este patógeno y son críticos para la colonización exitosa y para su patogenicidad (22-24).

Otro factor de virulencia son las proteasas. Aunque la función primaria de éstas, secretadas por bacterias asacarolíticas como *P. gingivalis*, es proporcionar nutrientes para el crecimiento, las proteasas también están involucradas directamente en la invasión y destrucción tisular y en la evasión y modulación de las defensas del huésped. Se ha demostrado que las proteasas de este microorganismo degradan el colágeno tipo I y IV (componentes principales del tejido conectivo periodontal), las proteínas de la matriz extracelular, activan las metaloproteinasas de la matriz, activan/ inactivan el complemento y las citoquinas, estimulan la muerte celular y alteran las funciones de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que tienen un papel importante en la defensa local contra la agresión bacteriana y en el control de la inflamación. A la familia de proteasas que se ha vinculado estrechamente con la virulencia de *P. gingivalis* se le da el nombre de gingipaínas (22-24).

*P. gingivalis* puede contribuir a la pérdida del hueso alveolar mediante la estimulación de la resorción ósea, induciendo la destrucción ósea e inhibiendo la formación del hueso. El LPS puede activar los osteoclastos y provocar la liberación de prostaglandina E2 y de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los macrófagos, monocitos y fibroblastos. Estos compuestos son potentes mediadores locales de la resorción ósea y, además, pueden inhibir la síntesis de colágeno por parte de los

osteoblastos e inducir la producción de metaloproteinasas que destruyen el tejido conectivo y el hueso (23).

También *P. gingivalis* es capaz de inducir periodontitis cuando se encuentra en baja concentración. Hajishengallis y colaboradores han considerado a este patógeno como “keystone pathogen” (26).

Las proteínas son marcadores alternativos de la función biológica, ya que reflejan la actividad real con respecto a las reacciones metabólicas y a las cascadas reguladoras y proporcionan mejor información sobre la actividad microbiana que los genes funcionales. El término proteoma fue introducido por Wilkins para describir el conjunto de todas las proteínas expresadas por un genoma (27, 28). El uso de proteínas como marcadores alternativos condujo al establecimiento de la proteómica como área de investigación (29). Así la proteómica es el estudio de todo el conjunto de proteínas expresadas por un organismo en un determinado ambiente, en una etapa específica del ciclo celular. También abarca su relativa abundancia, distribución, funciones e interacciones con otras macromoléculas y modificaciones postraduccionales (30). Actualmente, es posible usar técnicas proteómicas para identificar por lo menos del 50 a 70% del proteoma predicho para la mayoría de las bacterias cultivadas en una condición de crecimiento específica (29).

A lo largo de estos años, en combinación con los métodos clásicos, las aproximaciones basadas en la espectrometría de masas (MS) se han convertido en las herramientas indispensables para descifrar la abundancia exacta de proteínas en mezclas compuestas (31). Esta técnica está bien establecida y emplea las estrategias de cuantificación “Label-based” y Label-free”. Los métodos de cuantificación “label-based” emplean marcajes de isótopos estables que son incorporados a los péptidos, introduciendo una diferencia de masa esperable dentro de dos o más condiciones experimentales. En cambio, las técnicas proteómicas “label-free” cuantifican la cantidad de proteína relativa y

absoluta utilizando la intensidad de la señal y el conteo espectral de los péptidos (31).

Los experimentos proteómicos basados en la espectrometría de masas implican varios pasos previos de separación de las proteínas. Estos pasos previos se pueden separar en dos enfoques principales (Figura 3) (29):

- i. electroforesis en gel bidimensional (2D-GE)
- ii. cromatografía de líquidos (LC) -MS / MS

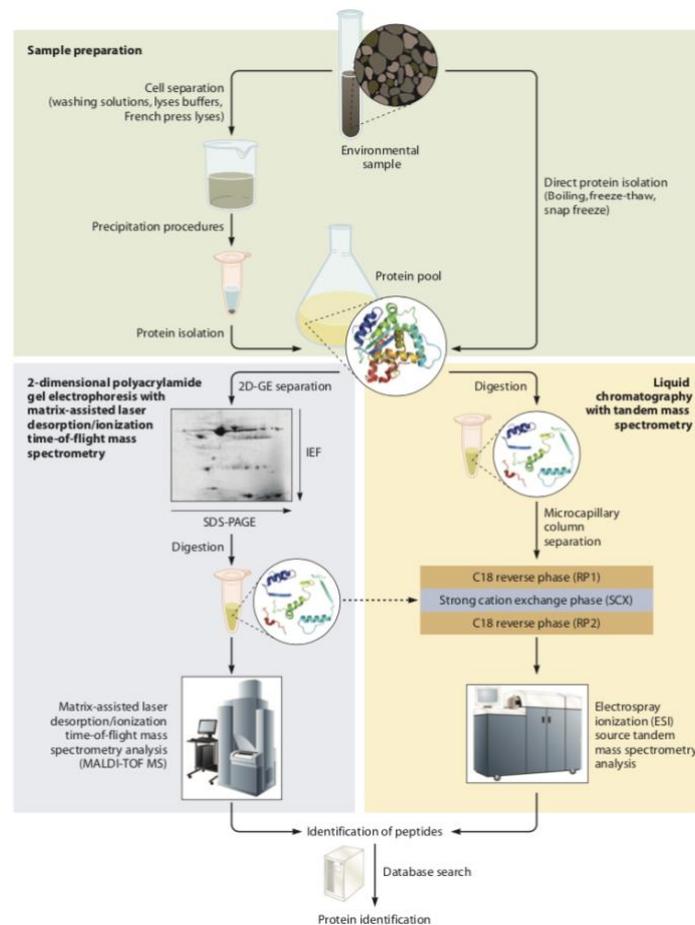


Figura 3: Las dos técnicas principales basadas en la utilización de espectrómetro de masas. Adaptado de Keller and Hettich 2009.

El protocolo para la cuantificación de proteínas "Label-free" por LC-MS es un enfoque "bottom-up", lo que significa que las proteínas deben ser digeridas en péptidos previamente. El proceso analítico se realiza a nivel de péptido (32, 33). Así, esta técnica se basa en la identificación de péptidos generados por la digestión proteolítica de la

mezcla de proteínas. La presencia de una proteína en la mezcla original se infiere mediante el uso de una base de datos de secuencias de proteínas con las secuencias peptídicas identificadas. La coincidencia de una secuencia de péptidos única para una proteína en particular proporciona evidencia de la proteína en la mezcla original (34). El acoplamiento de la cromatografía líquida a nanoescala (*nanoLC*) a la espectrometría de masas permite la separación en línea de mezclas complejas de péptidos antes del análisis de MS, evitando así la necesidad de geles bidimensionales.

Las principales ventajas de las técnicas de “Label-free” son que, por lo general, no requieren pasos experimentales adicionales, la cuantificación comparativa se puede realizar en muchas muestras simultáneamente, la concentración de la muestra puede ser más baja y que la preparación de la muestra no es tan compleja (35, 36).

## **2. Objetivos**

El objetivo del estudio es la evaluación de la expresión diferencial de proteínas de *Porphyromonas gingivalis* cuando están formando biofilm respecto a cuando están en estado planctónico.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- Búsqueda e identificación de proteínas que se expresan diferencialmente en el biofilm respecto al estado planctónico, como posibles blancos para futuras terapias que permitan bloquear la incorporación de bacterianas patógenas a la placa bacteriana;

### 3. Material y Métodos

#### 3.1. Cultivo y cepa bacteriana

La cepa utilizada en este trabajo ha sido *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. La bacteria se cultivó en placas de medio Agar Sangre (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado con 5% (v/v) de sangre de caballo estéril (Oxoid); 5.0 mg/L de hemina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 1.0 mg/L de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones anaeróbicas (10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y equilibrio de N<sub>2</sub>) a 37°C durante 24-72 h. Para el crecimiento en biofilm y en el estado planctónico se utilizó el medio BHI modificado el cual estaba compuesto por Brain Heart Infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) suplementado con 2.5 g/L de mucina (Oxoid), 1.0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0.1 g/L de cisteína (Sigma), 2.0 g/L de bicarbonato sódico (Merck), 5.0 mg/L de hemina (Sigma), 1.0 mg/L de menadiona (Merck) y 0.25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, en condiciones de anaerobiosis, a 37°C.

#### 3.2. Formación del biofilm monoespecie de *P. gingivalis*

El biofilm monoespecie de *P. gingivalis* se desarrolló sobre discos estériles de hidroxapatita en una placa multipocillo de 24 pocillos. El cultivo planctónico se incubó en unos tubos de plástico de 50 mL tipo Falcon. En ambos casos, a partir de un cultivo bacteriano en fase exponencial en el medio BHI modificado, se ajustó la concentración bacteriana a 10<sup>7</sup> ufc/mL y se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 96 horas.

### **3.3. Recuperación de las bacterias presentes en el biofilm y en el cultivo planctónico**

Para recuperar las bacterias que forman el biofilm en esta superficie se procedió de la siguiente forma: se extrajo el disco, se añadió 1 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline), se vorteoó durante 3 minutos recogiendo la suspensión, añadiéndola a un *ependorf* y centrifugando a 13000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Para recuperar las bacterias en estado planctónico, se centrifugó la suspensión bacteriana a 9000 rpm a 4°C durante 10 minutos y el pellet se guardó a -20°C.

### **3.4. Extracción y solubilización de las proteínas bacterianas**

El siguiente paso fue la extracción de las proteínas bacterianas que se encontraban en el biofilm y en las células planctónicas. Se procedió a la rotura de la célula en un tampón adecuado para evitar la lisis de las proteínas, la agregación proteica y favorecer la resuspensión de las mismas. Los precipitados se resuspendieron en PBS junto con inhibidores de proteasas para evitar la lisis proteica. Este tampón estaba compuesto de lo siguiente: PBS + 100 mM Dithiothreitol (DTT, agente reductor) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) + 100 mM Fluoruro de metil fenil sulfonato (PMSF, inhibidor de proteasas) (Sigma) + mezcla nucleasa (GE Healthcare) + cocktail inhibidor proteasas 10X (Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania). El método empleado para romper y liberar el contenido celular fue la sonicación que consiste en la rotura de las membranas bacterianas producida por ondas de ultrasonido mediante un sonicador ultrasónico de punta (Branson Sonifier™ ultrasonic cell disrupter, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) con pulsos discontinuos de 20 milisegundos durante 3 segundos. Posteriormente, se centrifugó para descartar el "debris" celular.

Posteriormente, se procedió a la limpieza de la muestra para eliminar posibles restos de sales, detergentes, lípidos e impurezas varias, que pueden interferir en el proceso de separación proteica. Esto se realizó precipitando las proteínas con el método metanol/cloroformo. Las proteínas se solubilizaron en urea 8M mediante agitación con vortex y utilizando un sonicador de baño (para favorecer la solubilización). Las muestras se sometieron a ultrasonidos cuatro veces durante 5 minutos (poniéndolas en hielo cada vez). Posteriormente, se centrifugaron para eliminar todo aquello que no se había solubilizado.

### **3.5. Cuantificación de proteínas**

Las muestras fueron cuantificadas empleando el método de Bradford y mediante el fluorímetro *Qubit 3.0*. Para comprobar la cuantificación, se realizó un gel SDS-PAGE al 10% con 8 µg de proteína de cada una de las muestras.

### **3.6. Digestión de las proteínas**

Posteriormente se procedió a la digestión con tripsina en gel. De acuerdo con la cuantificación obtenida, se tomaron 50 µg de cada una de las muestras y se cargaron en un gel concentrador (*stacking gel*) para su limpieza, antes de la digestión. El *stacking gel* es un gel SDS-PAGE discontinuo con una porción de gel concentrador al 4% seguida de gel separador al 10%. La electroforesis se paró cuando el frente estaba a unos 3 mm del comienzo del gel separador. La banda de la muestra correspondiente a las proteínas sin separar, se visualizó con tinción de *Coomassie* coloidal y se recortó para su posterior digestión en gel.

Las proteínas presentes en la banda del *stacking gel*, se digirieron con tripsina. Para ello las proteínas fueron reducidas con 10 mM de DTT a 56°C durante 30 min y luego se alquilaron con 55 mM de Iodacetamida durante 20 min en oscuridad. Finalmente se añadieron 2 µg de tripsina

recombinante grado secuenciación (Roche) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8.5) y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se realizó una extracción de péptidos con acetonitrilo (ACN) al 80%, TFA 0.1% durante 15 min. Se secaron por centrifugación a vacío (*SpeedVac, Savant*) y se reconstituyeron en 30 µl de 2% ACN, 0.1% Acido Fórmico (AF) y se conservaron a -20°C hasta su análisis.

### **3.7. Experimento Label Free**

Se compararon dos condiciones: Biofilm y Planctónico. De cada una de las condiciones se analizaron por LC-MS/MS tres réplicas biológicas independientes, sin réplicas técnicas.

#### **Análisis LC-MS/MS (Q-exactiveHF)**

Los péptidos se analizaron por nano-cromatografía líquida (nano Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q- Exactive HF (Thermo Scientific, Mississauga, ON, Canada). Los péptidos fueron concentrados "on-line" por cromatografía de fase reversa (RP) usando una precolumna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific, 20mm x 75 µm ID, C18 de 3 µm diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro) y separados en una columna analítica de fase reversa C18 Picofrit (Nikkyo technos Co.,Ltd; NTCC-360/75-3-125 de 150 mm x 75 µm ID, 3 µm de diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro) con punta integrada para spray, operando a un flujo de 250 nl/min. Los péptidos fueron eluidos usando un gradiente desde el 5% hasta el 35% de buffer B en 200min, de 35 a 50% en 10 min., y 10 min. mas al 95%. Se utilizaron, como buffer A, 0.1% de AF, 2% ACN en agua y como buffer B, 0.1% de ácido fórmico en ACN.

El nano-HPLC estaba acoplado on-line a la fuente nanoelectrospray del espectrómetro de masas Q-exactive HF con el que se analizaron los

péptidos. La entrada de los péptidos se realizó por ionización con electrospray utilizando la punta integrada en la columna analítica.

La adquisición de datos se realizó con un voltage de 1.8 Kv para el electrospray y el "ion transfer tube" que guía los iones desde el spray hasta el interior del espectrómetro de masas tenía una Tª de 250°C.

Los péptidos fueron detectados con una resolución de 60.000 en modo Full scan MS en un rango de masas m/z de 350-2000 Da. Los datos MS/MS fueron adquiridos en modo de adquisición dependiente de la información (Data-dependent acquisition (DDA)) del MS. Así, en cada microscan se seleccionaron hasta 15 precursores con carga de 2+ a 4+, en función de su intensidad (umbral:  $2 \times 10^3$ ), con exclusión dinámica de 20 segundos, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de +/- 2 unidades de m/z, en un tiempo máximo de 100 ms para su fragmentación por HCD (High Collision Dissociation) con una energía de colisión Normalizada (nce) del 27 %. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo.

### **3.8. Identificación de Proteínas**

Los espectros MS/MS adquiridos en las muestras se analizaron a través del software Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific) con el motor de búsqueda MASCOT v.2.6.1. Se utilizaron las bases de datos SwissProt con restricción taxonómica a *Porphyromonas gingivalis* (versión 03/09/2018; 24612 secuencias) y la base de datos Contaminants (247 secuencias) que incluye los contaminantes más habituales.

**Parámetros de búsqueda para la identificación:** Los parámetros empleados en las búsquedas fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0,02 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos para la tripsina permitidos, carbamidometil cisteína como

modificación fija y como modificaciones variables: oxidación de metionina y pérdida de Metionina+acetilación del extremo N-terminal de la proteína y acetilación del extremo amino terminal de la proteína.

Como criterio de identificación se utilizó el algoritmo percolator para estimar el FDR (tasa de falsos positivos) y se filtró por un q-value <0.01 para las proteínas identificadas con alta confianza.

### **3.9. Cuantificación relativa de las proteínas mediante el software Proteome Discoverer 2.2**

Para determinar las abundancias de los péptidos y las proteínas identificadas se inició un flujo de procesamiento. El primer paso fue la recalibración de las masas mediante una búsqueda rápida en Sequest HT contra la base de datos y en base a las identificaciones obtenidas, un alineamiento de los cromatogramas de todas las muestras con una tolerancia de hasta 10 min.

Posteriormente se produjo el alineamiento de los tiempos de retención entre las distintas muestras analizadas para la cuantificación de los iones precursores, teniendo en cuenta los péptidos únicos y los péptidos razor (péptidos compartidos entre un grupo de proteínas) que estén presentes en al menos un 30% de las réplicas, sin tener en cuenta los péptidos modificados.

Finalmente se normalizó la cantidad total de proteína entre las diferentes muestras utilizando la abundancia total de todos los péptidos.

#### **Agrupación de muestras y cuantificación.**

Se seleccionó un diseño non-nested/Parwise ya que las réplicas eran independientes. En este diseño se calcularon los ratios de los péptidos como la mediana geométrica de todas las combinaciones de

los ratios de las réplicas biológicas para los factores de estudio seleccionados. El ratio de la abundancia de la proteína se calculó posteriormente como la mediana geométrica de los ratios del grupo de péptidos.

### **Cuantificación y análisis estadística**

Para poder comparar la abundancia de una proteína entre muestras se normalizaron los datos, consiguiendo el factor de corrección adecuado para cada una de las muestras, de manera que la cantidad total de proteína sea la misma en todas.

Para testar si la abundancia de una proteína varía entre categorías (Biofilm, Planctónico) se aplicó el test estadístico de Análisis de la Varianza (ANOVA) para estimar la probabilidad de que estas medidas sean diferentes entre categorías.

Para descartar los cambios falsos-positivos estimados por el p-value, para un determinado nivel de FDR, se corrigió el p-value, por el test ac hoc de Benjamin-Hochberg consiguiendo un p-value ajustado también llamado Q-value, que controla mejor el FDR.

Para realizar la cuantificación de proteínas se aplicaron una serie de filtros para determinar que proteínas son cuantificables. En la cuantificación de proteínas se aplicaron una serie de filtros para determinar si una proteína se expresa de forma diferencial entre condiciones:

- **Abundance ratio variability:** La variabilidad de los ratios calculada en porcentaje debe presentar un valor por debajo del 30% y por encima del 0%. Este último caso es para eliminar aquellas proteínas que se han cuantificado a partir de una sola medida.
- **P-value<0,05:** Las proteínas cuantificadas deben tener un p-value < 0.05 para obtener significación estadística.

- **Q-value:** El Q-value corrige la proporción de falsos positivos para un valor de probabilidad elegido como umbral de significación. Los cambios son significativos cuando alcanza un q-value < 0.05.
- **Fold Change (FC):** Se consideran proteínas diferenciales aquellas cuyo valor en  $\log_2(\text{ratio}) \geq \pm 0.6$ , es decir, cuando es mayor o igual que 0.6, la abundancia de esa proteína es al menos 1,5 veces su valor comparada con la condición control (FC  $\geq 1.5$ - proteínas que se sobre-expresan); o menor o igual -0.6 si la abundancia está al menos por debajo del 0.66 del valor en la proteína control (FC  $\leq 0.66$ - proteínas que se reprimen).

## **4. Resultados**

### **4.1. Desarrollo del biofilm y cultivo planctónico**

Debido a la complejidad en el estudio de la expresión diferencial de proteínas bacterianas presentes en el biofilm y en células planctónicas mediante herramientas proteómicas, se procedió a la formación de un biofilm monoespecie (generado con una sola especie bacteriana) con la bacteria periodontopatógena *P. gingivalis*.

Para ello se puso a punto la formación del biofilm (concentración de células y días de incubación empleados). Se probaron las concentraciones de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  ufc/mL de suspensión bacteriana en fase exponencial crecida en medio BHI modificado; los biofilms se generaron a los tiempos de incubación de 24, 48, 72 y 96 horas en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Se comprobó por CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) y mediante análisis por cultivo bacteriano, que la concentración óptima era de  $10^7$  ufc/mL y el periodo óptimo de incubación era de 96 horas. En el caso de las células en estado planctónico se realizaron las mismas comprobaciones y se concluyó que la concentración de  $10^7$  ufc/mL y el tiempo de 96 horas eran los óptimos para el análisis en este modo de crecimiento.

### **4.2. Estudio de la expresión diferencial**

Para la realización del ensayo, se obtuvieron 3 réplicas biológicas por condición (Biofilm, Planctónico) de *P. gingivalis* (Bio1, Bio2, Bio3; Pla2, Pla3, Pla4). La recuperación de las bacterias, la extracción proteica, la limpieza y la solubilización de las proteínas se hizo como se ha descrito en Materiales y Métodos. Tras llevar a cabo la cuantificación, se observó que en el caso de las muestras de biofilm no se encontraba mucha cantidad de proteína, por lo que sería necesario hacer "pooles" o grupos de muestras para obtener la cantidad necesaria de proteína. Aunque en el

caso de las células planctónicas sí que existía suficiente cantidad de proteína, sería necesario realizar también los mismos “pooles” para que la comparación entre biofilm-célula planctónica fuese la correcta. Las muestras fueron cuantificadas mediante el fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo). Las concentraciones obtenidas y la cantidad total de proteína/muestra de acuerdo al volumen se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: concentraciones y cantidades totales de proteína

	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Pla 2	Pla 3	Pla 4
<b>Concentración (µg/µl)</b>	0.525	0.730	0.74	0.935	1.15	1.244
<b>Volumen Total (µl)</b>	126	171	161	171	146	76
<b>Proteína total (µg)</b>	66.1	125	119.1	160	168	94.2

El gel de control de carga, se realizó al 10% con 8 µg de proteína de cada una de las muestras, teniendo en cuenta la cuantificación anterior. Según se observa en la Figura 4, las tres muestras correspondientes al biofilm y las tres muestras correspondientes al planctónico tenían una cantidad aproximadamente igual dentro de la misma condición, y, por tanto, la cuantificación era correcta.

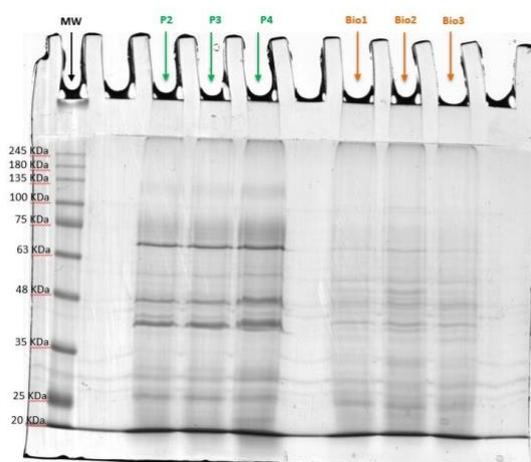


Figura 4: SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie (CCB).

Para la limpieza de las muestras previamente antes de digerirlas con tripsina, se cargaron en un gel concentrador (stacking gel) y se tiñeron con azul de Coomassie como se observa en la figura 5.



Figura 5: Geles teñidos con Azul de Coomassie (CCB) de las muestras.

### 4.3. Experimento Label Free

De cada una de las condiciones se analizaron tres réplicas biológicas independientes como he indicado anteriormente. Se analizaron primero las 3 réplicas consecutivas de biofilm, seguidas de dos blancos (para limpiar las columnas de la nano-LC), y luego las 3 réplicas consecutivas de planctónico.

Los resultados que se obtuvieron tras analizar los espectros obtenidos con las restricciones indicadas anteriormente, se encuentran resumidos en la Tabla 2: fue posible cuantificar un total de 614 proteínas de las cuales 73 presentaban expresión diferencial.

Tabla 2: Resultados de la proteínas obtenidas

	<b>Proteínas</b>
<b>Proteínas cuantificadas</b>	614
<b>p-value &lt;0.05</b>	73
<b>p-value &lt;0.05 up-regulated</b>	28
<b>p-value &lt;0.05 down-regulated</b>	45

De las 73 proteínas que se expresaban diferencialmente, 28 se sobre-expresaban y 45 se reprimían en el biofilm (tabla 3 y tabla 4 respectivamente).

Tabla 3: proteínas que se sobre-expresan en el biofilm

Accession	Description	Average Ratio (log2): (Bio) / (P)	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Planc. 2	Planc. 3	Planc. 4
B2RJ07	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase (RuvA)	6,64	High	High	High	Not Found	Not Found	Not Found
A0A0E2LS08	Guanine deaminase	6,64	High	High	High	Not Found	Not Found	Not Found
A0A0K2J8F2	Uncharacterized protein	6,64	High	High	High	Not Found	Not Found	Not Found
B2RGS8	Uncharacterized protein	6,24	High	High	High	Peak Found	High	High
A0A0E2M4I7	Uncharacterized protein	5,15	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
B2RGM8	NAD-dependent protein deacylase	5,14	High	High	High	Peak Found	Not Found	Peak Found
A0A254N032	Uncharacterized protein	5,12	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
A0A0E2M7L7	PglZ domain protein	5,06	High	Peak Found	High	Peak Found	Not Found	High
B2RHM3	Upregulated in stationary phase protein A	4,41	Peak Found	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
A0A1R4DYG6	Outer membrane surface receptor antigen RagB type 4	4,27	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
Q7MU10	Acyl carrier protein	3,93	High	High	High	High	Peak Found	High
B2RGQ9	50S ribosomal protein L19	3,59	High	Peak Found	High	Not Found	Not Found	Peak Found
Q7MXB3	Secretion activator protein, putative	3,55	High	High	High	Peak Found	Peak Found	High
A0A1R4AFI2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,54	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
A0A212GB70	50S ribosomal protein L4	3,47	Peak Found	High	High	Peak Found	Not Found	Peak Found
A0A0E2LQM7	L-aspartate oxidase	3,46	High	High	High	Not Found	Peak Found	Not Found
B2RL61	Elongation factor Ts	3,35	High	High	High	Peak Found	Peak Found	High
A0A1R4AF04	Uncharacterized protein	3,34	High	High	High	High	Peak Found	High
A0A0K2J3K5	Uncharacterized protein	3,3	High	High	High	Peak Found	Peak Found	High
B2RJ04	Meso-diaminopimelate D-dehydrogenase	3,26	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
A0A0E2M337	Tyrosine recombinase XerC	3,22	Peak Found	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
T2N7W1	Glucose-6-phosphate isomerase	3,13	High	High	High	High	High	Peak Found
A0A134DQ16	Uncharacterized protein	3,1	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
A0A0E2LR82	Transporter, small conductance mechanosensitive ion channel MscS family protein	3,08	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Not Found
Q7MTI5	Hemagglutinin protein HagB	2,98	High	High	High	Peak Found	Peak Found	Peak Found
A0A0E2M6E0	Phosphorylase family protein	2,95	High	High	High	High	High	Peak Found
A0A254MKK2	Thiol peroxidase	2,94	High	High	High	High	High	High

Tabla 4: Proteínas que se reprimen en el biofilm

Accession	Description	Average Ratio (log2): (Bio) / (P)	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Planc. 2	Planc. 3	Planc. 4
A0A2A6E5Q5	Methylmalonyl-CoA mutase	-2,27	Peak Found	Peak Found	High	High	High	High
B2RMH6	Uncharacterized protein	-2,29	Not Found	Not Found	Peak Found	High	Peak Found	High
A0A0E2LTS7	Efflux transporter, RND family, MFP subunit	-2,3	Peak Found	Not Found	Peak Found	Peak Found	High	High
B2RII3	35 kDa hemin binding protein	-2,33	High	High	High	High	High	High
A0A254MSW4	Histidine ammonia-lyase	-2,34	High	High	High	High	High	High
A0A254MUX3	Bifunctional protein FOLD	-2,37	High	Peak Found	High	High	High	High
B2RIQ1	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	-2,39	High	High	High	High	High	High
Q8L195	Pg-II fimbriae A	-2,4	High	High	High	High	High	High
A0A1R4DVA5	GTP pyrophosphokinase	-2,42	High	Not Found	High	High	Not Found	High
A0A1R4AGA5	Outer membrane protein P59 TapA	-2,47	Peak Found	Peak Found	Not Found	High	High	High
A0A0E2LNT6	Tyrosine--tRNA ligase	-2,49	Not Found	Peak Found	Peak Found	Not Found	Not Found	High
B2RIN7	Saccharopine dehydrogenase	-2,51	Peak Found	Not Found	Peak Found	Peak Found	Peak Found	High
Q7MVC9	Glycosyl transferase, group 1 family protein	-2,55	Peak Found	Not Found	Peak Found	Not Found	Not Found	High
A0A2D2N4L9	Methionine--tRNA ligase	-2,59	Peak Found	Peak Found	High	High	High	High
A0A212GA00	Proline--tRNA ligase	-2,59	Peak Found	Peak Found	Peak Found	High	High	High
B2RHG3	Minor fimbrium tip subunit Mfa3	-2,63	High	High	High	High	High	High
A0A212G885	Fumarate hydratase class I	-2,64	Peak Found	Peak Found	High	High	High	High
B2RLT2	Uncharacterized protein	-2,78	Peak Found	High	Peak Found	High	High	High
B2RH57	Major fimbrium subunit FimC	-2,83	High	Peak Found	Peak Found	High	High	High
A0A1R4ADP2	Formate--tetrahydrofolate ligase	-2,9	High	High	High	High	High	High
Q7MX91	Uncharacterized protein	-2,98	High	High	High	High	High	High
Q7MVJ2	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing, putative	-3,05	Peak Found	Peak Found	High	High	High	High
A0A1R4DPH0	Acyl-CoA dehydrogenase	-3,06	Peak Found	Peak Found	High	High	High	High

<b>B2RLN4</b>	Putative v-type ATPase subunit D	-3,08	Peak Found	Peak Found	Peak Found	High	High	High
<b>B2RH59</b>	Major fimbrium tip subunit FimE	-3,1	Peak Found	Peak Found	Peak Found	High	High	High
<b>A0A0E2LR02</b>	Chaperone protein HtpG	-3,14	Peak Found	Peak Found	Peak Found	Peak Found	Not Found	High
<b>B2RHG1</b>	Minor fimbrium subunit MfaI	-3,17	High	High	High	High	High	High
<b>B2RK02</b>	Acetate kinase	-3,4	High	High	High	High	High	High
<b>B2RH85</b>	Uncharacterized protein	-3,42	Peak Found	Peak Found	Not Found	Not Found	Not Found	High
<b>A0A0E2LRN2</b>	4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase	-3,51	Peak Found	Peak Found	Peak Found	High	High	High
<b>B2RJU4</b>	Putative NADPH-NAD transhydrogenase	-3,76	High	Peak Found	High	High	High	High
<b>A0A0K2J7Y7</b>	Uncharacterized protein	-3,88	Not Found	Not Found	Peak Found	High	Peak Found	High
<b>P19665</b>	Superoxide dismutase [Mn/Fe]	-4,25	Not Found	Peak Found	High	High	High	High
<b>A0A0E2M7G9</b>	Butyrate--acetoacetate CoA-transferase subunit B	-4,4	Peak Found	Peak Found	Peak Found	High	High	High
<b>B2RLM6</b>	Putative ferredoxin 4Fe-4S	-4,84	High	Peak Found	Peak Found	High	High	High
<b>R4WWA2</b>	Fimbrillin	-5,53	High	Peak Found	Peak Found	High	High	High
<b>R4WWE6</b>	Fimbrillin	-5,93	Peak Found	High	Peak Found	High	High	High
<b>U2JKQ1</b>	Uncharacterized protein	-6,64	Not Found	Not Found	Not Found	Peak Found	Peak Found	High

Las proteínas que se sobre-expresaban ( $FC \geq 1.5$ ), estaban implicadas principalmente en traducción, estrés oxidativo y eran proteínas de función desconocida. Por otro lado, las proteínas que se reprimían estaban implicadas en metabolismo, biosíntesis y en síntesis de las fimbrias.

## 5. Discusión

Gracias a las técnicas proteómicas, ha mejorado nuestra comprensión sobre el comportamiento celular al estudiar los diferentes patrones de actividad de las proteínas y cómo ocurren estas variaciones durante el desarrollo o en respuesta al proceso de la enfermedad. Como fue mencionado anteriormente, es posible identificar del 50 al 70% del proteoma de la mayoría de las bacterias cultivadas en una sola condición de crecimiento. Por lo tanto, el nivel actual de medición del proteoma ya está bastante profundo en el rango dinámico de las proteínas expresadas (29). Existe evidencia científica sobre el distinto comportamiento entre bacterias de la misma especie cuando se presentan en el estado planctónico respecto a cuando están formando biofilm, sobre todo en cuanto a su expresión genética (37-39) y proteica (40-42), y este diferente comportamiento nos puede ayudar a entender el papel del biofilm en el proceso patogénico de la bacteria.

En el presente estudio fue utilizada una técnica proteómica denominada "Label-free" que tiene como principales ventajas la mayor facilidad en la preparación de la muestra y la pequeña cantidad de muestra necesaria para realizar los ensayos. Pero tiene como desventaja frente a otras técnicas proteómicas que no se puede tener una visión global del proteoma como ocurre en los geles bidimensionales y no se pueden analizar las modificaciones post-traduccionales. En este trabajo hemos obtenido un total de 73 proteínas que se expresan diferencialmente. De éstas 28 se sobre-expresaban y 45 se reprimían en el biofilm frente al estado planctónico.

Dentro de las proteínas reprimidas, encontramos proteínas relacionadas con el metabolismo y con la biosíntesis de moléculas como azúcares, proteínas o aminoácidos. Esto es consistente con la reducida actividad metabólica y con la reducida tasa de crecimiento que ocurre en los biofilms maduros (7, 8, 43). La tasa de crecimiento más lenta de las

células en un biofilm se ha atribuido a la penetración restringida de nutrientes y ayuda a explicar, por ejemplo, la resistencia relativa de los biofilms a los antibióticos. Como las células bacterianas procedentes del biofilm muestran una tasa de crecimiento más lenta, la necesidad de energía es menor (39). Estos resultados son consistentes con otros estudios que evalúan las diferencias en la expresión de proteínas cuando las bacterias están formando biofilm (40-43). A pesar de esto, también se han encontrado un total de 7 proteínas relacionadas con el metabolismo y con biosíntesis que se sobre-expresan en el biofilm. La mayoría de estas proteínas estaban relacionadas con el metabolismo y con la biosíntesis de algunas moléculas como NAD<sup>+</sup>, ácidos grasos o lisina. Puede ocurrir que en el biofilm se sobre-expresen unas proteínas implicadas en metabolismo y que se repriman otras, ya que éste cambia dependiendo del modo de crecimiento.

Los microorganismos que se encuentran en el modo de crecimiento de biofilm, muestran una mayor capacidad virulenta, un aumento en la resistencia a compuestos antimicrobianos, presentan una mayor respuesta al estrés ambiental y desarrollan numerosos mecanismos de respuesta inmunológica frente al huésped (7, 44). Sería de esperar que en nuestros resultados encontrásemos, en las proteínas que se sobre-expresan, un elevado número de proteínas relacionadas con la virulencia de este patógeno. Sin embargo, en nuestro estudio sólo encontramos en este modo de crecimiento dos proteínas sobre-expresadas relacionadas directamente con la virulencia de la bacteria, en contraste con las 7 proteínas implicadas en virulencia que se reprimen. Una posible explicación para estos resultados, es el hecho de que unas de las propiedades más destacables de *P. gingivalis*, es que su patogenicidad se expresa sólo en comunidades microbianas mixtas (30) y en el presente estudio hemos utilizado un biofilm monoespecie. Se ha descrito que *P. gingivalis* a niveles de colonización muy bajos, desencadena cambios en la cantidad y composición de la microbiota comensal oral que conduce a la pérdida ósea en la periodontitis (25).

El concepto de proteoma tiene algunas diferencias con el genoma, ya que si bien solo hay un genoma definitivo de un organismo, el proteoma es una entidad que puede cambiar en diferentes condiciones y puede ser diferente en diferentes tejidos en un organismo. Sin embargo, un proteoma sigue siendo un producto directo de un genoma y los grupos funcionales deben coincidir (28). Romero-Lastra y col., y Sánchez y col. han evaluado la diferencia de expresión génica de *P. gingivalis* cuando se encuentra en estado planctónico y cuando está formando biofilm o está empezando a formarlo. En estos estudios, los genes que codifican proteínas involucradas en la adhesión, invasión y virulencia (mayoritariamente genes implicados en formación de las fimbrias) se encontraban reprimidos en el biofilm (37, 38). Estos resultados corroboran los nuestros, ya que hemos identificado varias proteínas relacionadas con las fimbrias que se reprimían en el biofilm. Una posible explicación para esto es que las fimbrias son importantes en las fases iniciales de formación del biofilm, pero pueden no ser necesarias en las últimas etapas de su formación. La represión de estas proteínas puede estar relacionada con la última etapa de la formación del biofilm que es el desprendimiento de las células (45).

En general, las restantes proteínas que se sobre-expresan siguen el mismo patrón que lo publicado en otros estudios de expresión diferencial. Kuboniwa y col., investigaron la expresión diferencial de proteínas de *P. gingivalis* cuando se encontraba formando biofilm con *Streptococcus gordonii* y *Fusobacterium nucleatum*. Como en nuestro estudio, los autores han observado un aumento en la expresión de proteínas ribosomales (implicadas en traducción) y proteínas implicadas en transcripción (46). Respecto a las proteínas involucradas en la reparación del ADN, en nuestro estudio hemos identificado dos proteínas que se sobre-expresan cuando la bacteria está en modo biofilm. Las proteínas de reparación de ADN generalmente se inducen en presencia de daño en el ADN. En el estudio mencionado anteriormente, este tipo de proteínas está presente en menor número en el biofilm de *P. gingivalis*

cuando está con las otras especies bacterianas que cuando se encuentra sola. Los autores mencionan que el biofilm monoespecie experimenta más daño en el ADN que cuando *P. gingivalis* forma biofilm con las otras dos especies, donde la presencia de los organismos proporciona protección contra ese daño, lo que puede explicar nuestros resultados (46). También Romero-Lastra y colaboradores han demostrado que diversos genes relacionados con la función ribosomal, con la transcripción y con la reparación del ADN se sobre-expresaban en biofilm (37). En bacterias, la producción del ribosoma requiere hasta un 40% de la energía de la célula. Parece que las bacterias con deficiencia en los ribosomas pueden, en cierta medida, aumentar el número de ribosomas acumulados en condiciones de crecimiento deficientes o bajo desafío antibiótico para compensar su función más lenta. Así, la sobre-expresión de los genes que codifican las proteínas ribosómicas de *P. gingivalis* puede reflejar una respuesta compensatoria para una función más lenta o alterada del ribosoma (47).

En nuestro estudio también hemos encontrado la presencia de dos proteínas sobre-expresadas en el biofilm relacionadas con el estrés oxidativo. Como se ha descrito, las bacterias cuando se encuentran formando biofilm, presentan una mayor resistencia al estrés ambiental. Es por ello, que la expresión de estas proteínas se emplee probablemente para reducir la cantidad de especies reactivas de oxígeno y proteger las células contra el estrés oxidativo (48).

Importante señalar que el estudio que aquí se presenta es de *P. gingivalis*, en un biofilm monoespecie y no como parte de un biofilm multiespecie como en la placa dental subgingival. No obstante, el estudio proporciona información útil sobre las diferencias de expresión de proteínas que ocurren cuando la bacteria crece formando un biofilm.

Como prospectiva futura, sería necesario validar funcionalmente algunas de estas proteínas, para poder aclarar su papel en el desarrollo

de la periodontitis ya que estas proteínas pueden ser buenas candidatas en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

## 6. Conclusión

- En este estudio hemos comprobado que hay expresión diferencial de las proteínas de *P. gingivalis* cuando están formando biofilm respecto a cuando se encuentran en estado planctónico, siendo que de las 73 proteínas que se expresaban diferencialmente, 28 se sobre-expresaban y 45 se reprimían en el biofilm.
- El estudio de estas proteínas diferenciales bacterianas nos puede permitir encontrar dianas para futuras terapias que permitan bloquear o mermar la incorporación de esta bacteria en la placa bacteriana.



## 7. Agradecimientos

A mi tutor, Profesor Doctor Mariano Sanz, por todas sus enseñanzas, simpatía y por toda su disponibilidad. Fue un honor para mi haber aceptado ser mi tutor y es algo que nunca olvidaré.

A Dra. Arancha Llama Palacios por todo lo que me ha enseñado sobre Microbiología y Proteómica, por todo su apoyo incondicional, amistad, consejos y sobretodo paciencia.

A Oksana Potupa por todo lo que me ha enseñado en el laboratorio y por todo el apoyo, la ayuda y amistad que siempre me ha demostrado.

A mis padres, hermana y Márcia por todo el apoyo y comprensión en estos años de ausencia, por hacer posible toda mi trayectoria académica hasta ahora, por confiar en mi y por estar siempre presentes en los buenos momentos y en los menos buenos. A Honorato Ribeiro Vidal, un amigo incansable, que fue mi gran apoyo en Madrid y que siempre me ayudó y estuvo presente en todos los momentos menos buenos.

A todo el personal del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid por todo el apoyo, simpatía y ayuda que me han ofrecido.

A la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid donde se han realizado los experimentos de "label-free" e identificación de proteínas.



## 8. Bibliografía

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45 Suppl 20:S162-S70.
2. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*. 2018;89 Suppl 1:S159-s72.
3. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology*. 2017;44 Suppl 18:S94-S105.
4. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 1987;41:435-64.
5. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 1995;49:711-45.
6. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005;32 Suppl 6:7-15.
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):167-93.
9. Marsh PD, Bowden GHW, Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M. Microbial community interactions in biofilms. 2000:167-98.
10. Lang NP, Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 2 Volume Set: Wiley; 2015.
11. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002;28:12-55.

12. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):16-35.
13. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Molecular Oral Microbiology*. 2013;28(2):83-101.
14. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2002;66(3):486-505, table of contents.
15. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*. 2006;42:47-79.
16. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(7):471-80.
17. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*. 1996;1(1):926-32.
18. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998;25(2):134-44.
19. Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *Journal of Periodontology*. 1992;63 Suppl 4S:322-31.
20. Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri F, Sayehmiri K, Sheikhi A, Zamanian Azodi M. Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2017;31(1):355-62.
21. Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri K, Sayehmiri F, Tavirani M, Dousti M, et al. Prevalence of Anaerobic Bacteria (*P. gingivalis*) as Major Microbial Agent in the Incidence Periodontal Diseases by Meta-analysis. *Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)*. 2018;19(3):232-42.
22. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype

polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2005;38:72-122.

23. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 1998;62(4):1244-63.

24. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*. 2000;15(6):341-9.

25. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskin MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe*. 2011;10(5):497-506.

26. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(10):717-25.

27. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology* (Nature Publishing Company). 1996;14(1):61-5.

28. Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1996;13(1):19-50.

29. Keller M, Hettich R. Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 2009;73(1):62-70.

30. Gupta A, Govila V, Saini A. Proteomics - The research frontier in periodontics. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2015;5(1):46-52.

31. Anand S, Samuel M, Ang CS, Keerthikumar S, Mathivanan S. Label-Based and Label-Free Strategies for Protein Quantitation. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2017;1549:31-43.

32. Savidor A, Levin Y. Quantification of proteins by label-free LC-MS(E.). *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2014;1156:223-36.
33. Levin Y, Bahn S. Quantification of proteins by label-free LC-MS/MS. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2010;658:217-31.
34. O'Neill JR. An Overview of Mass Spectrometry-Based Methods for Functional Proteomics. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2019;1871:179-96.
35. Patel VJ, Thalassinos K, Slade SE, Connolly JB, Crombie A, Murrell JC, et al. A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(7):3752-9.
36. Wong JW, Cagney G. An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2010;604:273-83.
37. Romero-Lastra P, Sanchez MC, Ribeiro-Vidal H, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, et al. Comparative gene expression analysis of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in planktonic and biofilms states. *PloS One*. 2017;12(4):e0174669.
38. Sanchez MC, Romero-Lastra P, Ribeiro-Vidal H, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, et al. Comparative gene expression analysis of planktonic *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in the presence of a growing biofilm versus planktonic cells. *BMC Microbiology*. 2019;19(1):58.
39. Lo AW, Seers CA, Boyce JD, Dashper SG, Slakeski N, Lissel JP, et al. Comparative transcriptomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* biofilm and planktonic cells. *BMC Microbiology*. 2009;9:18.
40. Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001;205(1):139-46.
41. Llama-Palacios A, Potupa O, Sanchez MC, Figuero E, Herrera D, Sanz M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Growth in Biofilm

versus Planktonic State: Differential Expression of Proteins. *Journal of Proteome Research*. 2017;16(9):3158-67.

42. Ang CS, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Application of <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O reverse proteolytic labeling to determine the effect of biofilm culture on the cell envelope proteome of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Proteomics*. 2008;8(8):1645-60.

43. Rathsam C, Eaton RE, Simpson CL, Browne GV, Berg T, Harty DW, et al. Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology*. 2005;151(Pt 6):1823-37.

44. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38 Suppl 11:28-35.

45. Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S. Time course of gene expression during *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(18):6733-6.

46. Kuboniwa M, Hendrickson EL, Xia Q, Wang T, Xie H, Hackett M, et al. Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiology*. 2009;9:98.

47. Moon JH, Lee JH, Lee JY. Microarray analysis of the transcriptional responses of *Porphyromonas gingivalis* to polyphosphate. *BMC Microbiology*. 2014;14:218.

48. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2012;9(3):311-23.