

**PURIFICACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO DE
Porphyromonas gingivalis LIBRE DE POLISACÁRIDOS UTILIZANDO
CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN SEPHACRYL S-200**

**Purification of *Porphyromonas gingivalis*
polysaccharide free lipopolysaccharide using Sephacryl S-200
high resolution chromatography**

DIEGO GUALTERO¹, M.Sc.; JAIME E. CASTELLANOS¹, Ph. D.;
GERARDO PÉREZ², Ph. D.; GLORIA I. LAFAURIE¹, DDS.

¹ Instituto Unidad de Investigación Básica Oral, Facultad
de Odontología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Química, Facultad
de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
Correspondencia: Gloria I. Lafaurie. Transversal 9A Bis No. 132-55.
Instituto UIBO, Facultad de Odontología, Universidad El Bosque,
Bogotá - Colombia. Teléfono: 57-1-6353713 Fax: 57-1-520 40 21
investigaciones.odontologia@unbosque.edu.co
gualterodiego@unbosque.edu.co

Presentado 17 de mayo de 2008, aceptado 20 de junio de 2008, correcciones 29 de octubre de 2008.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue mejorar un método estándar para la purificación de lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* libre de polisacáridos usando una estrategia de extracción, digestión enzimática y cromatografía de alta resolución. La bacteria *P. gingivalis* se cultivó en condiciones de anaerobiosis y se hizo extracción de las membranas con el método de fenol-agua. Luego de una digestión enzimática (DNAsa, RNAsa y proteasa) se separó el extracto por filtración por gel con Sephacryl S-200. La muestra purificada se caracterizó por electroforesis en gel de acrilamida con tinción de plata y por el método Purpald se detectó el ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO). Se obtuvo una preparación libre de ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos. La separación por cromatografía fue de alta resolución al permitir la obtención de dos picos con diferentes componentes. El protocolo de purificación nos permitió obtener LPS de *P. gingivalis* con alto grado de pureza, el cual podría ser usado en próximos ensayos para evaluar su función en ensayos *in vitro* e *in vivo*; así como iniciar la obtención de LPS de otras bacterias periodontopáticas, con el fin de investigar la asociación de enfermedad periodontal con enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: periodontitis; lipopolisacáridos, endotoxinas; cromatografía.

ABSTRACT

The aim of this work was to improve a standard methodology to purify *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) using a protocol of extraction, enzymatic digestion and high resolution chromatography. *P. gingivalis* bacteria was cultured in anaerobiosis, their membranes were extracted using the phenol-water method, then subjected to DNase, RNase and protease digestion and finally, the extract was separated by chromatography using Sephacryl S-200. The purified extract was characterized by silver staining after polyacrylamide gel electrophoresis and 2-keto-3-deoxioctanoic acid (KDO) was detected using the Purpald's method. A preparation free of nucleic acid-, protein- or polysaccharides was obtained. The chromatographic separation showed high resolution since there was two discrete peaks with different components. The purification protocol allowed us to obtain a highly purified *P. gingivalis* LPS which could be used in future tests to evaluate its behavior *in vitro* and *in vivo* and elucidate its function, as well as to obtain LPS from other periodontopathic bacteria to address the association of periodontal disease with cardiovascular diseases.

Key words: Períodontitis; lipopolysaccharide; endotoxin; chromatography.

INTRODUCCIÓN

Porphyromonas gingivalis es una bacteria Gram negativa anaerobia y uno de los principales patógenos asociados a la etiología de la enfermedad periodontal (Socransky y Haffajee, 1992). La prevalencia de *P. gingivalis* en la periodontitis crónica y agresiva está entre 50% y 90% respectivamente en poblaciones de Suramérica (Nogueira-Moreira *et al.*, 2001; Lopez, 2000). Según estudios de nuestro grupo, en Colombia la prevalencia general para este patógeno en personas con periodontitis es de 71,5% (Lafaurie *et al.*, 2007a). En la última década varios estudios clínicos han relacionado la periodontitis con riesgo cardiovascular (Desvarieux *et al.*, 2005; Loos *et al.*, 2000), sin embargo hace falta evidencia en investigación básica que permita ajustar la correlación y evaluar las presuntas vías implicadas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

P. gingivalis libera al periodonto vesículas de la membrana externa que contienen lipopolisacárido (LPS), ocasionando daño al tejido periodontal (Schwartz *et al.*, 1972; Moore *et al.*, 1986). Los LPS son glicolípidos de membrana externa exclusivos de las bacterias Gram negativas; estas moléculas están conformadas por tres regiones: el antígeno O, un core o núcleo y el lípido A. El antígeno O es una región polisacárida utilizada para la serotipificación de las cepas (Rietschel *et al.*, 1994). La región nuclear se subdivide en externa e interna; esta última contiene el ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), un octil glucósido característico de estas bacterias Gram negativas. Dependiendo del grado de diversificación estructural de la región polisacárida los LPS se pueden clasificar como de tipo liso (S), rugoso (R), o semirugoso (SR). El lípido A es la región lipídica del LPS, está conformado por dos glucosaminas con acilaciones por varios ácidos grasos y es la estructura responsable de la actividad endotóxica de los LPS (Ogawa, 1994).

El LPS de *P. gingivalis* induce la expresión de citoquinas proinflamatorias en cultivo de

fibroblastos gingivales humanos y también puede causar reabsorción ósea (Kumada *et al.*, 1995). Junto a otros factores de virulencia de *P. gingivalis*, el LPS induce la degradación de proteínas de matriz extracelular en cultivos de fibroblastos (Takii *et al.*, 2005). LPS de bacterias entéricas como *Escherichia coli* induce la expresión de citocinas en células dendríticas que conducen a una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1, diferente a la expresión de citocinas inducida por LPS de *P. gingivalis* cuya respuesta inmune es de tipo Th2 (Pulendran *et al.*, 2001). Sin embargo, la contribución potencial del LPS al progreso de la enfermedad periodontal no es clara debido a la compleja respuesta innata del hospedero a este componente de la pared celular y a la elevada heterogeneidad del LPS de *P. gingivalis* (Bainbridge y Darveau, 1997; Darveau *et al.*, 2004).

Estudios recientes han mostrado evidencia que apoya una correlación de la enfermedad periodontal con riesgo cardiovascular, debido a factores de virulencia de bacterias periodontopáticas en episodios de bacteriemias y endotoxemias en el hospedero luego del tratamiento periodontal (Gibson *et al.*, 2006; Ide *et al.*, 2004; Lafaurie *et al.*, 2007b). Uno de estos factores es el LPS de *P. gingivalis* que se ha detectado en el suero de pacientes con enfermedad periodontal. Pussinen *et al.*, 2004, reportaron que la presencia de LPS en suero de pacientes con periodontitis induce la activación, secreción de citocinas y captura de lipoproteínas LDL en macrófagos. Adicionalmente, un estudio reciente *in vitro* demostró que los macrófagos se activan con LPS de *P. gingivalis* y se transforman en células espumosas al aumentar la tasa de captura de LDL (Qi *et al.*, 2003). Estas investigaciones han permitido plantear un modelo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular relacionado con la periodontitis y sus factores de virulencia (Gibson *et al.*, 2006); sin embargo, se necesita más claridad sobre los mecanismos de activación sistémica del LPS de *P. gingivalis* y de otras bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal.

Debido a que los purificados de LPS de *P. gingivalis* han mostrado estructuras muy heterogéneas (Darveau *et al.*, 2004), el grado de pureza de los LPS utilizados en estudios de actividad biológica asociada a patogenicidad y riesgo cardiovascular es fundamental. Se han descrito varios protocolos para la purificación de polisacáridos (PS) y LPS de *P. gingivalis*, entre los que sobresalen los que usan extracción con fenol-agua (Westphal y Jann, 1965; Darveau y Hancock 1983; Koga *et al.*, 1985), o el reactivo Tri que contiene una mezcla de fenol y de tiocianato de guanidino (Yi y Hackett, 2000). Las preparaciones así obtenidas contienen una mezcla de PS, LPS, lipoproteínas, ácidos nucleicos y proteínas que podrían inducir resultados falsos positivos atribuibles a LPS en ensayos biológicos (Hashimoto *et al.*, 2004). Schifferle *et al.*, 1989, estandarizaron un método de extracción y purificación de polisacáridos a partir de bacteria completa de *P. gingivalis* utilizando fenol-agua, digestión enzimática con nucleasas, proteasas y purificación por cromatografía con Sephacryl S-400 HR. Con esta metodología se evidenció un perfil cromatográfico que no separa polisacáridos de lipopolisacáridos. Por esta razón, en este estudio nos propusimos modificar el método de purificación de polisacáridos descrito por Schifferle *et al.*, 1989, para la obtención de LPS con un mayor grado de pureza, utilizando una cromatografía con Sephacryl S-200. Ésta resina recientemente ha sido utilizada para la purificación de un nuevo tipo de LPS de *P. gingivalis* (A-LPS) con unidades repetidas de polisacáridos aniónicos, que se diferencian en las unidades repetidas de glicanos del LPS común (O-LPS) con unidades de

repetición tetrasacáridas en el antígeno O (Rangarajan *et al.*, 2008). Las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión por tamaño fueron caracterizadas bioquímicamente por espectrofotometría, PAGE-SDS con tinción específica para LPS y el método Purpald. Este último, mediante unas reacciones químicas oxidativas con peryodato de sodio, identifica glicoles vecinales terminales sin modificar (UTVG), presentes en carbohidratos como el KDO y heptosas, característicos de la región nuclear de los LPS (Lee y Tsai, 1999), pudiendo así determinar la pureza del extracto de LPS de *P. gingivalis*.

MÉTODOS

CULTIVO DE BACTERIAS

La bacteria de referencia *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) fue adquirida en la *American Type Culture Collection* y cultivada en el Laboratorio de Microbiología Oral, Universidad El Bosque, de acuerdo a los protocolos ya estandarizados. La bacteria fue cultivada en condiciones anaerobias por 15 días (5% CO₂, 10% H₂ y 85% N₂) en agar Brucella (BBL TM-Brucella Agar Becton Dickinson, USA) enriquecido con 0,3% de BactoTM-Agar (Becton Dickinson, USA), 0,2% de extracto de levadura (Becton Dickinson USA), 5% de sangre de cordero, 0,0005% de hemina y 0,00005% de menadiona (Sigma, USA). La bacteria fue sometida a una caracterización confirmatoria de rutina usando la prueba de CAAM (2-Gly-Gly-Arg-amido-4-methylcoumarin. Sigma, USA) que detecta proteasas bacterianas (tripsina y otras). Además, se realizaron pruebas enzimáticas api-ZYM (Biomerieux. Lyon, Francia), que evalúa la presencia y actividad de proteasas, fosfatasas, esterases, amidasas, lipasas y sacarasas de origen bacteriano. Se considera característica la reacción positiva a tripsina y a fosfatasas ácida y alcalina (Slots, 1987; Hirschfeld *et al.*, 2000).

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO FENOL-AGUA

Las bacterias completas de *P. gingivalis* (6,4 g) fueron recolectadas y resuspendidas en 15 mL de agua desionizada estéril y se adicionó un volumen igual de fenol equilibrado en Tris-HCl 10 mM pH 8,0. La suspensión bacteriana se incubó a 65 °C por 20 minutos en agitación y fue almacenada toda la noche a 4 °C. Esta suspensión fue centrifugada (4000x g a 4 °C, por 20 min), separando la fase acuosa la cual se dializó a 4 °C contra agua tipo 1 estéril usando membranas con poro de 10 kDa (Amersham Biosciences. Piscataway, USA). A este extracto se le agregó NaCl para lograr una concentración final de 0,15 M y fue sometido a digestión enzimática con ribonucleasa A (0,01 mg/mL) por dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó MgCl₂ a una concentración final de 4 mM y deoxirribonucleasa I (0,005 mg/mL) por seis horas a temperatura ambiente. Para eliminar las proteínas del extracto, se adicionó CaCl₂ a una concentración final de 1 mM y el extracto fue tratado con proteinasa K (0,05 mg/mL) toda la noche a 37 °C. Por último, la muestra se dializó por tres días en agua desionizada estéril (18,3 M ohm) realizando cambios del agua cada 12 horas, luego la muestra se liofilizó y se almacenó a -20 °C.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LPS

El material liofilizado fue resuspendido en buffer DOC (Tris-HCl 0,05 M, 1,5% deoxicolato de sodio, pH 8,0) y se aplicó sobre el soporte (1X100 cm) de Sephacryl S-200 HR (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) previamente equilibrado en el mismo buffer DOC. La elución se realizó con el mismo buffer y fracciones de 1,3 mL fueron recolectadas. Se realizó un análisis espectrofotométrico a cada una de las fracciones a longitudes de onda de 220, 260 y 280 nm. Los LPS presentan máxima absorción a 200 nm al igual que el deoxicolato, por lo tanto para evitar la recolección de falsos positivos, las fracciones con absorbancia a 280 nm fueron recolectadas según la recomendación de Schifferle *et al.*, 1989. Las fracciones fueron reunidas y nombradas como fracción I y II (Fig. 1). Para eliminar el deoxicolato de sodio de las muestras, se les agregó NaCl a una concentración final de 0,015 M y cinco volúmenes de etanol al 95% y se incubaron por 16 horas a 4 °C. Luego de centrifugar (12400 g a 4 °C por 20 min) el precipitado se resuspendió en 1,5 mL de agua, se dializó en agua desionizada estéril por 18 horas a 4 °C y se liofilizó. Estas muestras purificadas, se resuspendieron a una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada estéril. Este extracto fue sometido a un barrido espectrofotométrico, análisis electroforético y ensayo Purpald, para determinar las características bioquímicas de los LPS.

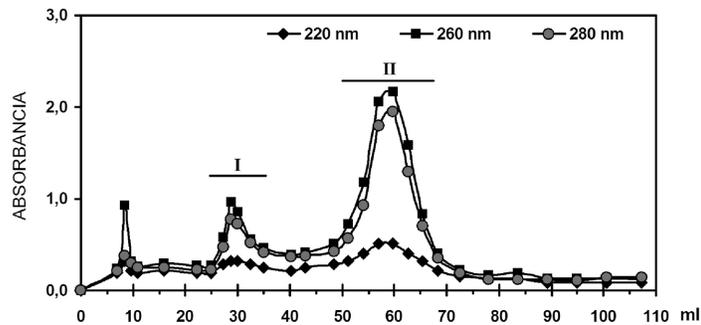


Figura 1. Cromatograma de la separación del extracto de *Porphyromonas gingivalis* usando un soporte de Sephacryl S-200. La absorbancia de las fracciones se evaluó a 220 nm (diamantes), a 260 nm (cuadros) y a 280 nm (círculos). Nótese la presencia de la Fracción I alrededor de los 30 mL, al parecer correspondiente a polisacáridos y la Fracción II que se eluye entre los 50 y los 70 mL, que corresponde al LPS purificado. En este caso, la baja absorbancia a 220 nm se debe a que el blanco usado para la medición fue el buffer DOC.

ELECTROFORESIS PAGE-SDS Y TINCIÓN DE LPS

Para la caracterización de LPS según su perfil electroforético, se realizó una electroforesis en poliacrilamida (Laemmli, 1970), con gel de concentración al 4% y gel de separación al 12%. Los extractos provenientes de las fracciones cromatográficas I y II, fueron resuspendidos en buffer Laemmli (pH 6,8), hervidos por cinco minutos y sembrados. Las condiciones de corrido fueron 12 mA en el gel de concentración y 20 mA para el de separación. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata según el protocolo de Tsai y Frasch, 1982. Se usaron LPS de *Escherichia coli* (ATCC 12740) y de *Salmonella typhimurium* (ATCC 7823) como controles positivos (Sigma, USA).

ENSAYO PURPALD

Para la caracterización química de LPS, se cuantificó la presencia de KDO en las fracciones I y II del extracto purificado de LPS de *P. gingivalis* según la metodología de Lee y Tsai, 1999. Para el análisis cuantitativo se realizó una regresión lineal, utilizando una curva de calibración con estándar de KDO (Sigma, USA), de 25 a 400 μM . Las fracciones I y II del extracto de LPS, y los controles, fueron valorados a una concentración de 0,5 mg/mL. La reacción colorimétrica por el método Purpald fue medida a 550 nm en un lector de ELISA Stat Fax-2100 (Awareness Technology Inc, Palm city, USA). Como controles se utilizaron LPS de *E. coli* y LPS de *S. typhimurium*. Las muestras fueron valoradas por duplicado.

ENSAYO COLORIMÉTRICO FENOL - ÁCIDO SULFÚRICO

Para determinar la presencia de polisacárido de *P. gingivalis* en la fracción I purificada, se hidrolizó la muestra a una concentración de 1 mg/mL con H_2SO_4 a una concentración final 0,018 M y se calentó a 100 °C por 20 minutos. Las muestras se dejaron enfriar antes del ensayo. La cantidad de carbohidratos fue calculada en las muestras teniendo como referencia una curva de concentración estándar de glucosa desde 500 hasta 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma, USA). El control de glucosa y las muestras fueron analizadas por cuadruplicado por el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico reportado por Dubois *et al.*, 1956.

RESULTADOS

Las pruebas enzimáticas para la caracterización específica de *P. gingivalis* fueron positivas, confirmando el género y especie de esta cepa, ya que morfológicamente es similar a otras *Porphyromonas* (datos no mostrados). El protocolo de extracción con fenol-agua sumado a la digestión con proteasas y nucleasas, permitió obtener un extracto crudo de LPS (10,8 mg). Este fue sometido a cromatografía de exclusión por tamaño en Sephacryl S-200 HR. En la figura 1 se muestra el perfil cromatográfico a 220 nm, en el que se observan dos picos (fracciones I y II) claramente separados a diferencia de lo obtenido por Schifferle *et al.*, 1989, quien solamente observó un pico con absorción a

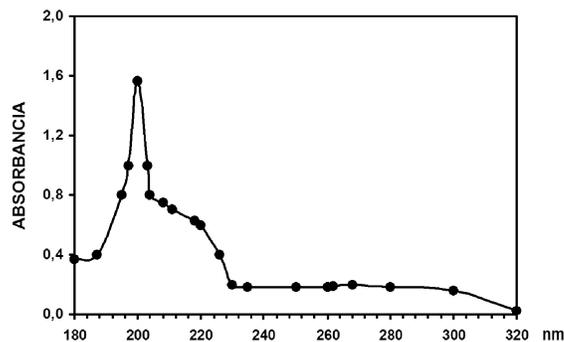


Figura 2. Imagen del barrido espectrofotométrico de la muestra extraída de *P. gingivalis* y purificada por cromatografía (fracción II). La absorción se presenta solo alrededor de los 200 nm, lo cual es característico de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas.

280 nm. También se observa en estas dos fracciones a 260 y 280 nm, la detección de ácidos nucleicos y proteínas. Después de eliminar el buffer DOC de ambas fracciones por precipitación con etanol y NaCl se determinó el espectro de absorción de la fracción II entre 180 y 350 nm, observándose un máximo a 200 nm (Fig. 2), longitud a la cual los LPS tienen máxima absorción (Perdomo *et al.*, 2006). Este resultado nos permite concluir que nuestro extracto estaba libre de ácidos nucleicos y proteínas. A partir de las fracciones I y II se obtuvieron liofilizados de 2,0 y 2,5 mg respectivamente.

Las fracciones I y II fueron sometidas a caracterización bioquímica. La presencia de LPS en las fracciones I y II se analizó mediante una separación electroforética en un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. La Fracción II, a diferencia de la Fracción I, presentó un patrón de bandas en escalera el cual es característico de LPS de bacterias Gram negativas como de *E. coli* y *S. typhimurium* con quimiotipos S (Smooth), utilizados como controles positivos (Fig. 3). Este patrón en escalera se origina de las diferentes longitudes de los carbohidratos presentes en el antígeno O de los LPS. Para determinar la presencia de KDO en las fracciones I y II se realizó el método de Purpald (Tabla 1). Se observaron valores positivos de KDO en la Fracción II, con una concentración de 35 μM . La fracción I y el LPS de *S. typhimurium* dieron concentraciones no significativas para KDO, debido a que se encuentran por debajo del nivel de detección de la prueba.

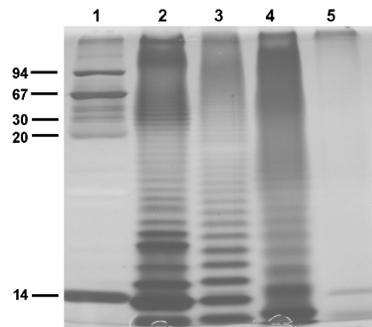


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 14%, teñido con nitrato de plata. Muestras provenientes de los pasos de extracción y purificación del LPS de *P. gingivalis*. Carril 1, marcador de bajo peso molecular (kDa). Carril 2, LPS de *E. coli* (5 μg). Carril 3, LPS de *S. typhimurium* (5 μg). Carril 4, LPS de *P. gingivalis* obtenido a partir de la Fracción II (15 μg). Carril 5, Fracción I, polisacáridos (15 μg).

Muestra (mg/mL)	KDO (μM)	Absorbancia 550 nm	Correlación
LPS <i>E. coli</i> (0,5)	152	0,297	
LPS <i>S. typhimurium</i> (0,5)	11	0,004	
Fracción I (0,5)	24	0,031	R ² = 0,99
Fracción II (0,5)	35	0,053	

Tabla 1. Cuantificación de KDO en extractos de LPS por el método Purpald.

Por el método colorimétrico fenol sulfúrico se confirmó la presencia de carbohidratos en la fracción I purificada (Tabla 2). Este resultado nos sugiere que la fracción I contiene polisacáridos de *P. gingivalis*. Por último, se determinó la capacidad endotóxica de las fracciones I y II mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL),

método de gelificación (LAL Pyrotell, Associates of Cape Cod Inc. USA). Solamente la fracción II fue positiva por el ensayo Pyrotell LAL (sensibilidad 0,03 EU/mL), determinando la propiedad endotóxica del LPS presente en la fracción II (datos no mostrados). La fracción I al ser negativa por este ensayo nos confirma la ausencia de LPS en esta fracción.

Muestra	Glucosa µg/mL	Absorbancia 495 nm	Desviación estándar	Correlación
Fracción I de <i>P. gingivalis</i>	147	0,166	± 0,0146	R2= 0,981

Tabla 2. Cuantificación de carbohidratos por el método fenol-ácido sulfúrico. Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado. Para la cuantificación de glucosa se realizó una curva de concentración conocida.

En conjunto, estas características bioquímicas (absorción a 200 nm, tinción y patrón de bandedo en electroforesis, contenido de KDO, cuantificación de glucosa y prueba LAL positiva), sugieren fuertemente que la Fracción II, purificada por cromatografía de exclusión de tamaño con Sephacryl S-200 HR, corresponde al LPS de *P. gingivalis*; mientras que, la fracción I, correspondería a polisacáridos de *P. gingivalis*.

DISCUSIÓN

El método para la obtención de LPS sugerido por Shefferle *et al.*, 1989, consiste en la extracción de LPS a partir de bacterias completas utilizando Fenol agua como reactivo de extracción (Westphal y Jann, 1965) y para la purificación del LPS a partir de extractos crudos utilizaron cromatografía de exclusión por tamaño en Sephacryl S-400. Otros estudios han utilizado este procedimiento para la purificación de PS y LPS (Preshaw *et al.*, 1999; Paramonov *et al.*, 2005). La utilización de fenol permite la obtención de LPS de tipo liso (Smooth) que se caracterizan por presentar la región del antígeno O con elevada glicosilación (Westphal y Jann, 1965).

El método de purificación de Darveau y Hancock, 1983, también ha sido utilizado en diferentes estudios para la purificación de LPS de *P. gingivalis* sin la utilización de fenol como reactivo de extracción (Reife *et al.*, 2006; Darveau *et al.*, 2004; Bodet *et al.*, 2006). Esta metodología permite la obtención tanto de LPS de tipo liso como LPS rugoso, que se caracterizan por presentar el antígeno O con pocas glicosilaciones ramificantes o ninguna. Independiente del reactivo de extracción utilizado, es común en estas metodologías, la utilización de enzimas DNasa, RNasa y proteinasa para liberar el extracto de contaminación por ácidos nucleicos y proteínas. Sin embargo, estas metodologías se diferencian en el procedimiento de purificación del LPS. La obtención de LPS libres de restos celulares y otras moléculas de la bacteria para el estudio de su estructura y actividad celular es fundamental para obtener resultados confiables (Hirschfeld *et al.*, 2000).

Los métodos más utilizados para la obtención de LPS de bacterias periodontopatógenas son la cromatografía de exclusión por tamaño y las ultracentrifugaciones. Paramonov *et al.*, 2005, utilizaron Sephacryl S-300 para la purificación de un PS aniónico de *P. gingivalis*. Posteriormente, utilizando Sephacryl S-200 este purificado fue caracterizado como A-LPS, un nuevo LPS de *P. gingivalis* con polisacáridos aniónicos

en lugar de unidades tetrasacáridas repetidas en el antígeno O presente en el LPS clásico (O-LPS; Rangarajan *et al.*, 2008). A través de ultracentrifugaciones Nakao *et al.*, 2006, purificaron O-LPS de *P. gingivalis*.

El proceso de purificación utilizando Sephacryl S-400 propuesto por Schifferle *et al.*, 1989, no permite diferenciar la fracción polisacárida de la lipopolisacárida de *P. gingivalis*. Con la matriz S-200 utilizada durante éste trabajo, se obtuvieron dos picos separados, denominados fracción I y II, que absorbieron a una longitud de onda de 220, 260 y 280 nm, observándose una notoria diferencia entre las fracciones (Fig. 1). Los LPS tienen su mayor absorción en el lejano visible a 200 nm (Rolando *et al.*, 2006); sin embargo, debido a la presencia de deoxicolato, que absorbe a esta misma longitud de onda, presente en el buffer de elusión, las fracciones fueron analizadas a 220 nm (Schifferle *et al.*, 1989). La Fracción II absorbió a 260 y 280 nm confirmando una posible contaminación de ácidos nucleicos y proteínas.

El ARN es el principal contaminante de LPS extraído con fenol (Westphal y Jann, 1965). Además la hidrólisis con DNasa y RNasa en el extracto originan oligorribonucleotidos y oligodesoxirribonucleotidos que pueden absorber a 260 nm. Por otro lado, trazas de fenol presente en la fracción II podría también absorber a esta misma longitud de onda (Perdomo *et al.*, 2006). La absorción a 280 nm puede ser debida a la presencia de aminoácidos producto de la digestión con proteasa o a la presencia misma de las distintas enzimas utilizadas en el proceso de digestión enzimática. Sin embargo, luego del proceso de precipitación con NaCl y etanol, de la fracción II, el purificado no mostró absorción a 260 y 280 nm, y presentó una absorción máxima a 200 nm luego de un barrido espectrofotométrico (Fig. 2), característico de LPS (Perdomo *et al.*, 2006).

Durante este estudio se adaptó el método de purificación de LPS de *P. gingivalis* reportado por Schifferle *et al.*, 1989, introduciendo algunas modificaciones, específicamente el tipo de columna cromatográfica utilizada durante la purificación (Sephacryl S-200 HR), lo cual permitió una mejor separación de los componentes de la mezcla pues la muestra se resolvió en dos picos, y adicionalmente la obtención de una muestra desprovista de proteínas y de ácidos nucleicos, con un rendimiento de 532 µg de LPS por 1 g húmedo de bacteria. En conclusión, la estrategia de purificación con fenol-agua, digestión enzimática y purificación cromatográfica ofrece ventajas, debido a que aumenta la pureza del extracto en comparación con otros sistemas reportados (Koga *et al.*, 1985; Fujiwara *et al.*, 1990; Williams y Holt, 1985), donde hay presencia de proteínas y polisacáridos.

El análisis del patrón de bandeo por electroforesis de la Fracción II, mostró un bandeo en escalera característico de O-LPS, que puede corresponder a un LPS quimiotipo liso de bacterias Gram negativas y que refleja el número de unidades repetidas presentes en el antígeno O del LPS (Fomsgaard *et al.*, 1990). La Fracción I del extracto purificado no mostró este patrón, sugiriendo tal vez su naturaleza de polisacárido pues este tipo de moléculas no tiñen con plata (Schifferle *et al.*, 1989; Tsai y Frasch, 1982; Hitchcock y Brown, 1983), ya que en este caso, la coloración depende de la presencia de estructuras lipídicas en la muestra (Kropinski *et al.*, 1986). La naturaleza polisacárida de la fracción I fue confirmada por el ensayo fenol-ácido sulfúrico. Este método ha sido utilizado antes para la caracterización bioquímica de PS de *P. gingivalis* (Nakao

et al., 2006). Además el ensayo LAL que se le realizó a ambas fracciones purificadas, nos permitió confirmar la propiedad endotóxica de la fracción II y descartarla en la fracción I (datos no mostrados).

La determinación de KDO por el método Purpald fue positiva para la fracción II y negativa para la fracción I, confirmando la presencia de KDO que normalmente está presente en el *core* interno de la estructura de LPS de Gram negativas. Existen reportes contradictorios sobre la presencia del KDO en preparaciones de LPS de *P. gingivalis*. Koga *et al.*, 1985, utilizando el método colorimétrico de Wrights y Reberts, 1972, no pudo identificar KDO y heptosas en purificados de LPS de *P. gingivalis* con el método de extracción fenol agua. Sin embargo, Fujiwara *et al.*, 1990, utilizando el método colorimétrico del ácido tiobarbiturico (Karkhanis *et al.*, 1978), encontraron concentraciones no significativas de KDO en sus preparaciones de LPS de *P. gingivalis*. Utilizando el método colorimétrico de Purpald, nosotros pudimos confirmar cuantitativamente la presencia del KDO en nuestras preparaciones de LPS. El análisis estructural por espectrometría de masas del *core* interno de LPS de *P. gingivalis*, que hasta el momento no se ha realizado, confirmaría los resultados obtenidos en este estudio sobre la presencia de KDO en la estructura de LPS de *P. gingivalis*. Aunque los resultados por el método Purpald dan positivos para KDO en el extracto purificado, hay que tener en cuenta que debido a la naturaleza de la reacción química durante el ensayo (oxidación de glicoles vecinales sin sustituir), es posible que también heptosas presentes en la estructura del LPS de *P. gingivalis* reaccionen positivamente, alterando el resultado obtenido. Probablemente los glicoles vecinales presentes en las heptosas presentan sustituciones en la estructura interna del LPS de *S. typhimurium*, lo cual impide la reacción de oxidación y la transformación de los alcoholes a grupos químicos como aldehídos, fundamentales en la reacción de Purpald (Lee y Tsai, 1999).

La muestra purificada, está siendo usada en estudios de activación celular y en el desarrollo de anticuerpos monoclonales que permitan detectar la bacteria o sus componentes en muestras de suero de pacientes con periodontitis sometidos a terapia mecánica periodontal. La metodología planteada en este trabajo podría ser utilizada en futuros estudios en nuestro grupo, para la obtención de LPS de otras bacterias periodontopáticas relacionadas con la periodontitis como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antes *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Nørskov-Lauritsen y Filian, 2006), *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythensis*, las cuales presentan una alta prevalencia en la población colombiana (Lafaurie *et al.*, 2007a). La participación de sus LPS en la patogénesis de la enfermedad periodontal y la relación con el riesgo cardiovascular no ha sido aún establecida.

AGRADECIMIENTOS

A las Doctoras: Isabel Mayorga de Fayad y Diana Castillo del Laboratorio de Microbiología Oral del instituto UIBO, por la donación de la cosecha de bacteria usada en este estudio. A Camilo Contreras, estudiante de la Universidad Nacional de Colombia, quien realizó algunos experimentos preliminares sobre la extracción fenólica. A los estudiantes de Biología de la Universidad El Bosque, Sebastián Bernau y Adriana Grosso, por la realización de algunos experimentos preliminares en la estandarización del método Purpald y tinción de geles. El presente trabajo fue financiado con recursos

del Proyecto No. 1308-04-11854 de Colciencias, la División de Investigaciones y la Facultad de Odontología de la Universidad El Bosque.

BIBLIOGRAFÍA

BAINBRIDGE BW, DARVEAU RP. Lipopolysaccharide from oral bacteria: role in innate host defense and chronic inflammatory disease. In: D. Morrison (ed.), Endotoxin in health and disease. Marcel Dekker, New York; 1997. p. 899-913.

BODET C, CHANDAD F, GRENIER D. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* Microbes Infect. 2006;8:27-35.

DARVEAU RP, HANCOCK RE. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J Bacteriol. 1983;155:831-38.

DARVEAU RP, PHAM T, LEMLEY R, REIFE R, BAINBRIDGE BW, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid a species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. Infect Immun. 2004;72:5041-51.

DESVARIEUX M, DEMMER RT, RUNDEK T, BODEN-ALBALA B, JACOBS DR JR, et al. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness. Circulation. 2005;111:576-582.

DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chemistry. 1956;28:350-6.

FOMSGAARD A, FREUDENBERG MA, GALANOS C. Modification of the silver staining technique to detect Lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. J Clin Microbiol. 1990;28:2627-31.

FUJIWARA T, OQAWA T, SOBUE S, HAMADA S. Chemical, immunobiological and antigenic characterization of Lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. J Gen Microbiol. 1990;136:319-26.

GIBSON FC 3RD, YUMOTO H, TAKAHASHI Y, CHOU HH, GENCO CA. Innate immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. J Dent Res. 2006;85:106-21.

HASHIMOTO M, ASAI Y, OGAWA T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. Int. Immunol. 2004;16:1431-1437.

HIRSCHFELD M, MA Y, WEIS JH, VOGEL SN, WEIS JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. J Immunol. 2000;165:618-22.

HITCHCOCK PJ, BROWN TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella lipopolysaccharide* chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J Bacteriol 1983;154:269-277.

IDE M, JAGDEV D, COWARD PY, CROOK M, BARCLAY GR, WILSON RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of

endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. J Periodontol. 2004;75:420-8.

KARKHANIS YD, ZELTNER JY, JACKSON J J, CARLO DJA new and improved microassay to determine 2-keto- 3 deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. Anal Biochem. 1978;85:595-601.

KOGA T, NISHIHARA T, FUJIWARA T, NISIZAWA T, OKAHASHI N, *et al.* Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. Infect Immun. 1985;47:638-47.

KROPINSKI AM, BERRY D, GREENBERG EP. The basis of silver staining of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Curr Microbiol. 1986;13:29-31.

KUMADA H, HAISHIMA Y, UMEMOTO T, TANAMOTO KI. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol. 1995;177:2098-106.

LAFaurie G, CONTRERAS A, BARÓN A, BOTERO J, MAYORGA-FAYAD I, JARAMILLO A, *et al.* Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. J Periodontol. 2007a;78:629-639.

LAFaurie GI, MAYORGA-FAYAD I, TORRES MF, CASTILLO DM, AYA MR, *et al.* Periodontopathic microorganisms in peripheric blood after scaling and root planning. J Clin Periodontol. 2007b;34:873-879.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;226:658-5.

LEE CH, TSAI CM. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by purpald assay: Measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deaoyoctonate and heptose et the inner core by periodate oxidation. Anal Biochem. 1999;267:161-168.

LOOS BG, CRAANDIJK J, HOEK FJ, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER VELDEN U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular disease in the peripheral blood of periodontitis patients. J Periodontol. 2000;71:1528-34.

LOPEZ NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. J Periodontol. 2000;71:948-54.

MOORE J, WILSON M, KIESER JB. The distribution of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in relation to periodontally involved root surfaces. J Clin Periodontol. 1986;13:748-51.

NAKAO R, HIDENOBU S, HARUO W. *Porphyromonas gingivalis* galE Is Involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation. Infect Immun. 2006;74(11):6145-53.

NOGUEIRA-MOREIRA A, FERNANDEZ CANIGIA L, FURMAN C, CHIAPPE V, MARCANTONI M, BIANCHINI H. Clinical and microbiological study of adult periodontal disease. Rev Argent Microbiol. 2001;33:133-140.

NØRSKOV-LAURITSEN N, KILIAN M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:2135-46.

OGAWA T. Immunobiological properties of chemically defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromonas* (bacteroides) *gingivalis*. Eur J Biochem. 1994; 219:737-42.

QI M, MIYAKAWA H, KURAMITSU HK. *Porphyromonas gingivalis* induces murine macrophage foam cell formation. Microb Pathog. 2003;35:259-67.

PARAMONOV N, RANGARAJAN M, HASHIM A, GALLAGHER A, ADUSE-OPOKU J, et al. Structural analysis of a novel anionic oligosaccharide From *Porphyromonas gingivalis* strain W50 related to Arg-gingipain glycans. Mol Microbiol. 2005;58:847-63.

PERDOMO R, MONTERO V. Purificación de lipopolisacáridos de *E. coli* 055:B5por cromatografía de exclusión molecular. Biotecnol Apl. 2006;23:117-23.

PRESHAW PM, SCHIFFERLE RE, WALTERS JD. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide delays human polymorphonuclear leukocyte apoptosis *in vitro*. J Periodontal Res. 1999;34:197-202.

PULENDRAN B, KUMAR P, CUTLER C W, MOHAMADZADEH M, DYKE TV, BANCHEREAU J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses In Vivo. J Immunol. 2001;167:5067-76.

PUSSINEN PJ, VILKUNA-RAUTIAINEN T, ALFTHAN G, PALOSUO T, JAUHAINEN M, et al. Severe periodontitis enhances macrophage activation via increased serum lipopolysaccharide. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:2174-80.

RANGARAJAN M, ADUSE-OPOKU J, PARAMONOV N, HASHIM A, et al. Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. J Bacteriol. 2008;190(8):2920-32.

REIFE RA, COATS SR, AL-QUTUB M, DIXON DM, BRAHAM PA, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. Cell Microbiol. 2006;8:857-68.

RIETSCHEL ET, KIRIKAE T, SCHADE FU, MAMAT U, SCHMIDT G, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 1994;8(2):217-25.

SCHIFFERLE RE, REDDY MS, ZAMBON JJ, GENCO RJ, LEVINE MJ. Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. J Immunol. 1989;143:3035-42.

SCHWARTZ J, STINSON FL, PARKER RB. The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. J Periodontol. 1972;43:270-276.

SLOTS J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescence assay for trypsin-like activity. Oral Microbiol Immunol. 1987;2:139-141.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE A. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. 1992;63:322-331.

TAKII R, KADOWAKI T, BABA A, TSUKUBA T, YAMAMOTO K. A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems. Infect Immun. 2005;73:883-893.

TSAI CM, FRASCH CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1982;119:115-19.

160 Artículo - *Purificación de lipopolisacárido de Porphyromonas gingivalis libre de polisacáridos utilizando cromatografía de alta resolución Sephacryl S-200. Gualtero, et al.*

WESTPHAL O, JANN K. Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965;5:83-91.

WILLIAMS GD, HOLT SC. Characteristics of the outer membrane of selected oral *Bacteroides* species. *Can J Microbiol.* 1985;31:238-250.

WRIGHT BG., REBERS PA. Procedure for determining heptose and hexose in lipopolysaccharides-modification of the cysteine-sulfuric acid method. *Anal. Biochem.* 1972;49:307-19.

YI EC, HACKETT M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst.* 2000;125:651-656.