

Identificación inmunoquímica de proteínas inmunogénicas de *Porphyromonas gingivalis*

Immunochemical Identification of Immunogenic Proteins from *Porphyromonas gingivalis*

Beltrán-López, E.¹ , Tiznado-Parra, N.N.¹ , Luque-Ortega, F.² , Arámbula-Meraz, E.¹ , Pineda-Hidalgo, K.³ , Vega-Castillo, U.¹ , López-Moreno, H.S.^{1*} .

¹Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80010

²Laboratorio Ciencias Básicas, Facultad de Odontología, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80010

³Laboratorio Genética y Bioquímica de Plantas, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80010

RESUMEN

Porphyromonas gingivalis es un patógeno estrechamente asociado a la periodontitis crónica, cuyas proteínas inmunogénicas desempeñan funciones esenciales en la interacción hospedero-patógeno y constituyen candidatos para el desarrollo de herramientas diagnósticas e inmunoterapéuticas. El objetivo de este estudio fue identificar proteínas inmunogénicas de *Porphyromonas gingivalis* mediante un análisis inmunoquímico utilizando sueros de ratones BALB/c inmunizados con un extracto proteico bacteriano (ECPg). El ECPg se preparó a partir de cultivos bacterianos (cepa ATCC 33277) y se empleó como antígeno en un esquema de inmunización intraperitoneal. La respuesta humoral se confirmó mediante ELISA. Posteriormente, el perfil proteico del extracto se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 %, mientras que las proteínas inmunogénicas se detectaron mediante *Western blot* utilizando los sueros inmunes. El ECPg presentó quince bandas proteicas, de las cuales siete (28, 33, 40, 54, 62, 72 y 104 kDa) fueron reconocidas por anticuerpos IgG específicos. La proteína de 62 kDa (p62) mostró la mayor inmunoreactividad, lo que sugiere que constituye el inmunógeno dominante del extracto. El análisis *in silico* permitió asignar la identidad putativa de seis proteínas, correspondientes a Omp28, fimbria Mfa5, Omp40, fimbria Mfa1, fosfotransacetilasa y gingipaina K, mientras que p62 permaneció sin identificación. Estos resultados demuestran que el ECPg contiene múltiples antígenos capaces de evocar una respuesta humoral específica y amplían el conocimiento del repertorio antigénico de *Porphyromonas gingivalis*, proporcionando una base para la caracterización estructural, funcional e inmunológica futura, en especial de p62.

Palabras clave: *Porphyromonas gingivalis*, Periodontitis, Antígenos, Bacteria, Western blot, Inmunoglobulina G

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis is a major periodontal pathogen whose immunogenic proteins play essential roles in host-pathogen interactions and represent promising targets for the development of diagnostic and immunotherapeutic strategies. This study aimed to identify immunogenic proteins of *Porphyromonas gingivalis* through an immunochemical analysis using sera from BALB/c mice immunized with a bacterial crude protein extract (ECPg). The ECPg was prepared from bacterial cultures (strain ATCC 33277) and used as an antigen in an intraperitoneal immunization protocol. The humoral immune response was confirmed by ELISA. Protein composition was analyzed by 12 % SDS-PAGE, whereas immunoreactive proteins were detected by *Western blot* using immune mouse sera. Fifteen protein bands were identified in the ECPg, of which seven (28, 33, 40, 54, 62, 72, and 104 kDa) were recognized by specific IgG antibodies. The 62-kDa protein (p62) exhibited the strongest immunoreactivity, suggesting that it represents the dominant immunogen within the extract. *In silico* analysis enabled the putative identification of six immunoreactive proteins as Omp28, Mfa5 fimbrial protein, Omp40, Mfa1 fimbrial protein, phosphotransacetylase, and K gingipain, whereas p62 remained unidentified. These findings demonstrate that the ECPg contains multiple antigens capable of eliciting a specific humoral immune response. Although protein identities remain putative and rely on bioinformatic correlation, this study expands the current knowledge of the antigenic repertoire of *Porphyromonas gingivalis* and provides a foundation for future structural, functional, and immunological characterization, particularly of the highly immunoreactive p62 protein.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Periodontitis, Antigens, Bacterium, Western Blotting, Immunoglobulin G

INTRODUCCIÓN

Porphyromonas gingivalis es un patógeno anaerobio Gram negativo asociado a la patogénesis de la periodontitis crónica, una enfermedad periodontal inflamatoria que se caracteriza por la afectación de los tejidos de soporte del órgano dental, cuya prevalencia global se estima entre el 20 % y el 50 % de la población adulta (Nazir et al., 2020; Oliva et al., 2022). Esta patología puede progresar desde formas leves caracterizadas por gingivitis reversible, hasta estados avanzados que implican la destrucción del ligamento periodontal, pérdida ósea alveolar y eventual pérdida dentaria (Sanchez et al., 2022). Además de sus manifestaciones locales, la periodontitis ha sido vinculada con diversas manifestaciones sistémicas, como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y trastornos neurodegenerativos, lo que resalta la importancia clínica de *Porphyromonas gingivalis* y su impacto en la salud pública (Messina et al., 2025).

La capacidad de *Porphyromonas gingivalis* para colonizar y persistir en el hospedero se atribuye a la expresión de múltiples factores de virulencia, entre los que destacan proteínas de superficie y componentes extracelulares implicados en procesos de adhesión, invasión y evasión de la respuesta inmune (Xu et al., 2020; Lunar & Cascales, 2021). Estas proteínas pueden ser reconocidas por el sistema inmune, evocando la respuesta humoral específica mediada por linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas, particularmente del isotipo IgG (Lunar & Cascales, 2021). En este escenario, la identificación de proteínas inmunogénicas constituye una estrategia relevante para comprender los mecanismos de interacción hospedero-patógeno, así como la identificación de blancos con potencial aplicación en el diagnóstico o en el desarrollo de estrategias terapéuticas. Diversos estudios han demostrado que pacientes con enfermedad periodontal desarrollan anticuerpos circulantes dirigidos contra proteínas específicas de este microorganismo, lo que refleja una interacción dinámica entre la respuesta inmune adaptativa y los factores de virulencia bacterianos (Chen et al., 1991; Franca et al., 2007). En este escenario, la identificación de proteínas reconocidas por anticuerpos constituye una aproximación útil para comprender los mecanismos de reconocimiento inmunológico que ocurren durante la infección, así como para seleccionar candidatos susceptibles de emplearse en el desarrollo de herramientas diagnósticas o de intervención biotecnológica.

A pesar de los avances en la caracterización genómica de *Porphyromonas gingivalis*, una proporción considerable permanece pobremente caracterizada o carece de asignación funcional definida (Reyes, 2021). En este contexto, el análisis inmunoquímico de extractos proteicos

bacterianos representa una aproximación biomédica útil para identificar proteínas inmunogénicas capaces de evocar una respuesta inmune adaptativa. La integración del análisis *in silico* con la inmunoquímica, permite proponer la identidad putativa de dichas proteínas como un primer acercamiento hacia la caracterización estructural y funcional.

En este estudio, se empleó un modelo murino con ratones de la cepa BALB/c inmunizando con un extracto proteico de *Porphyromonas gingivalis* (ECPg) con el objetivo de identificar proteínas inmunogénicas reconocidas por anticuerpos IgG mediante técnicas inmunoquímicas, como ELISA y *Western blot*. Adicionalmente, se realizó un análisis *in silico* para proponer la identidad putativa de las proteínas inmunogénicas detectadas, estableciendo así una base para el desarrollo de futuros estudios dirigidos a su caracterización bioquímica y funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se empleó la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, la cual se cultivó en medio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) suplementado con hemina (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), vitamina K (1 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), y L-Cisteína (500 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Los cultivos se incubaron a 37 °C bajo condiciones estrictas de anaerobiosis, conforme a las recomendaciones del proveedor y a procedimientos previamente descritos (Siemińska et al., 2021).

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones BALB/c hembra de 6–8 semanas de edad, mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo luz-oscuridad, con acceso *ad libitum* a agua potable y alimento comercial estandarizado para roedores de laboratorio Nutricubos® (Purina, México). Los animales fueron alimentados con *pellets* formulados específicamente para roedores de laboratorio, cuya composición proximal fue: proteína 23 %, grasa 3 %, fibra 6 %, humedad 12 %, cenizas 7 %, calcio 1 %, fósforo 0.60 % y extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) 49 %. Esta formulación está diseñada para satisfacer los requerimientos nutricionales durante todas las etapas del ciclo de vida de los roedores y contribuir a la reducción de la variabilidad biológica en estudios experimentales de largo plazo. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de conformidad con las normas institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio y

fueron aprobados por el Comité de Ética correspondiente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO DE *P. GINGIVALIS*

La biomasa bacteriana obtenida de cultivos en fase exponencial fue recuperada mediante centrifugación a $5\,000 \times g$ durante 20 min a 4 °C. El *pellet* celular se resuspendió en una variante del amortiguador de rehidratación (BHR) sin anfolitos, compuesto por urea 8 M, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) al 2 %, ditiotreitól (DTT) 50 mM y un cóctel comercial de inhibidores de proteasas *cOmplete* (Sigma-Aldrich, EE. UU.), sin ajuste de pH, conforme a las recomendaciones para el enfoque isoelectrico en gradientes de pH inmobilizados, siguiendo el procedimiento descrito por Piedra-Quintero et al. (2015), con modificaciones menores. La suspensión bacteriana se incubó durante 1 h a 4 °C y posteriormente fue sometida a disrupción celular mediante un sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole Palmer, EE. UU.) configurado a una potencia de salida de 50 W y frecuencia de operación de 20 kHz, utilizando tres ciclos de 30 s con intervalos de 30 s, manteniendo la muestra en hielo durante todo el procedimiento. El lisado obtenido se centrifugó a $13\,000 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante fue recuperado para precipitación proteica mediante la adición de ocho volúmenes de acetona (Sigma-Aldrich, EE. UU.) fría, incubándose posteriormente a -20 °C durante 12 h. El precipitado proteico se recuperó por centrifugación a $13\,000 \times g$ durante 10 min y se lavó cinco veces con 1 mL de metanol (JT Baker, EE. UU.) frío, eliminando completamente el disolvente entre cada lavado. Finalmente, las proteínas fueron secadas en un termobloque (Joanlab, China), resuspendidas en BHR e incubadas a 4 °C durante 48 h para favorecer su completa solubilización. La concentración proteica se determinó mediante el micrométodo de Bradford empleando un reactivo comercial (Sigma-Aldrich, EE. UU.), en microplacas de poliestireno con fondo plano, tipo ELISA (Thermo-Fisher Scientific, EE. UU.). La absorbancia se registró a 550 nm empleando un lector de microplacas Sinergy HTX (Biotek, EE. UU.) (Piedra-Quintero et al., 2015; Villa-Medina et al., 2025).

ANTICUERPOS ANTI-ECPg

Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 50 µg de extracto proteico de *Porphyromonas gingivalis* (ECPg) por dosis, siguiendo un esquema de tres inmunizaciones separadas por intervalos de diez días (día 0, día 10, día 20) (López-Moreno et al., 2003). La primera dosis se emulsificó 1:1 con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, EE. UU.),

mientras que las dos inmunizaciones posteriores se prepararon individualmente con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se obtuvieron muestras sanguíneas antes de la primera inmunización y siete días después del último refuerzo. Para ello, los animales fueron sujetos manualmente y la cola se calentó 5 minutos con una lámpara infrarroja de escritorio con bombillo de 100 W (Philips, EE. UU.) para favorecer la vasodilatación. Se efectuó una punción de la vena caudal, con una aguja estéril 25 G (BD, EE. UU.), recolectando por goteo en un tubo cónico estéril tipo Eppendorf de 1.5 mL (Axygen, EE. UU.), aproximadamente 200 µL de sangre. Posteriormente, se aplicó presión suave con gasa estéril en el sitio de la punción, hasta detener el sangrado. Este procedimiento se realizó siguiendo las guías de buenas prácticas para la obtención de sangre en roedores (Diehl et al., 2001). La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugada para recuperar el suero, el cual se almacenó a -20 °C hasta su utilización (López-Moreno et al., 2003).

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE ELISA

La producción de anticuerpos IgG específicos contra el ECPg fue determinada mediante un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA), siguiendo el procedimiento descrito previamente por López-Moreno et al. (2003). Brevemente, placas de alta afinidad para proteínas (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) fueron sensibilizadas con ECPg (50 µg/mL) preparado en amortiguador de carbonatos (pH 9.5). Después del bloqueo con leche descremada (Nestlé, EE. UU.) al 5 % preparada en amortiguador salino de fosfatos (PBS o PBST por sus siglas en inglés), a pH 7.2, suplementado con Tween 20 Sigma-Aldrich, EE. UU. al 0.1 %. Las placas se incubaron con diluciones seriadas de los sueros preinmunes e inmunes. La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (BioLegend, EE. UU.) (diluido 1:4000 en PBST) y *o*-fenilendiamina (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como sustrato cromogénico, disuelta en amortiguador de citratos pH 5.6 suplementado con H₂O₂. La reacción se detuvo con H₂SO₄ (JT Baker, EE. UU.) 1 M y la absorbancia se registró a 490 nm empleando un lector de microplacas Sinergy HTX (Biotek, EE. UU.) (López-Moreno et al., 2003).

OBTENCIÓN DEL PERFIL PROTEICO DE ECPg

El perfil proteico del ECPg se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 % de acuerdo con el método descrito originalmente por Laemmli y adaptado previamente por González et al. (2024). Se cargaron 5 y 10 µg de

proteína por carril y la separación electroforética se efectuó a 100 V durante 90 min. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad, EE. UU.) y posteriormente desteñidos con una solución de metanol 40 %, ácido acético glacial 10 % y agua desionizada 50 % (ambos reactivos fueron de la marca JT Baker, EE. UU.). La estimación del peso molecular se realizó empleando un marcador comercial preteñido *Dual-color* (Bio-Rad, EE. UU.) y el software PDQuest (Bio-Rad, EE. UU.) (González et al., 2024).

IDENTIFICACIÓN INMUNOQUÍMICA MEDIANTE WESTERN BLOT

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm (GE Healthcare, EE. UU.) mediante transferencia húmeda utilizando amortiguador de Towbin (Bio-Rad, EE. UU.). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada (Nestlé, EE. UU.) al 5 % preparada en PBST y cortadas en tiras individuales de 3 mm aproximadamente. Cada tira fue incubada independientemente con sueros preinmunes o inmunes diluidos 1:100, incluyendo controles negativos consistentes en membranas incubadas únicamente con PBST o en ausencia de anticuerpo primario. La detección de los inmunocomplejos se realizó utilizando el mismo anticuerpo secundario anti-IgG-HRP empleado en ELISA y diaminobencidina (DAB, Research Organics, EE. UU.) como sustrato cromogénico (Villa-Medina et al., 2025).

IDENTIFICACIÓN PUTATIVA DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS

Los pesos moleculares estimados para las bandas inmunorreactivas fueron comparados con la información disponible en las bases de datos *Protein Data Bank* (PDB), UniProt y *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con el propósito de proponer la identidad putativa de las proteínas reconocidas inmunológicamente.

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL MEDIANTE ALPHAFOLD

Para aquellas proteínas cuya estructura experimental no se encontraba disponible en el *Protein Data Bank* (PDB), se recuperaron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA desde la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se emplearon para la predicción estructural utilizando la plataforma AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024). Este algoritmo emplea un modelo de inteligencia artificial basado en aprendizaje profundo que integra información derivada de la secuencia primaria, alineamientos múltiples de secuencias (MSA), búsqueda de estructuras

homólogas, representaciones de pares de residuos (*Pairformer*) y un módulo generativo basado en difusión (*Diffusion Module*), permitiendo generar modelos tridimensionales a resolución atómica mediante procesos iterativos de refinamiento (*recycling*). (Abramson et al., 2024). La calidad de los modelos obtenidos fue evaluada mediante los parámetros de confianza proporcionados automáticamente por el servidor. La confiabilidad local de cada residuo se estimó utilizando el *Predicted Local Distance Difference Test* (pLDDT), considerando valores >90 como predicciones de muy alta confianza, entre 70 y 90 como modelos confiables, entre 50 y 70 como regiones de baja confianza y valores <50 como regiones probablemente desordenadas o estructuralmente inciertas. Asimismo, se examinó el *Predicted Aligned Error* (PAE) para evaluar la confianza relativa entre diferentes regiones estructurales y el *Predicted Template Modeling score* (pTM) como indicador de la confiabilidad global del plegamiento proteico. Los modelos obtenidos fueron empleados para apoyar la interpretación estructural y funcional de las proteínas inmunogénicas identificadas de manera putativa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en el ensayo ELISA fueron expresados como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de tres ratones BALB/c. La respuesta humoral específica contra el ECPg fue evaluada mediante un análisis de varianza de dos vías con medidas repetidas, considerando como variables independientes el estado inmunológico (preinmune e inmune) y la dilución sérica. La corrección de Geisser-Greenhouse fue aplicada cuando no se asumió esfericidad. Posteriormente, las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE *P. gingivalis*

El análisis electroforético mediante SDS-PAGE al 12 % permitió identificar quince bandas proteicas en el extracto proteico crudo de *Porphyromonas gingivalis* (ECPg), distribuidas en un rango aproximado de 12 a 150 kDa (Figura 1A). La presencia de múltiples componentes proteicos evidencia la complejidad del repertorio molecular presente en esta bacteria y concuerda con el hecho de que *Porphyromonas gingivalis* expresa una amplia

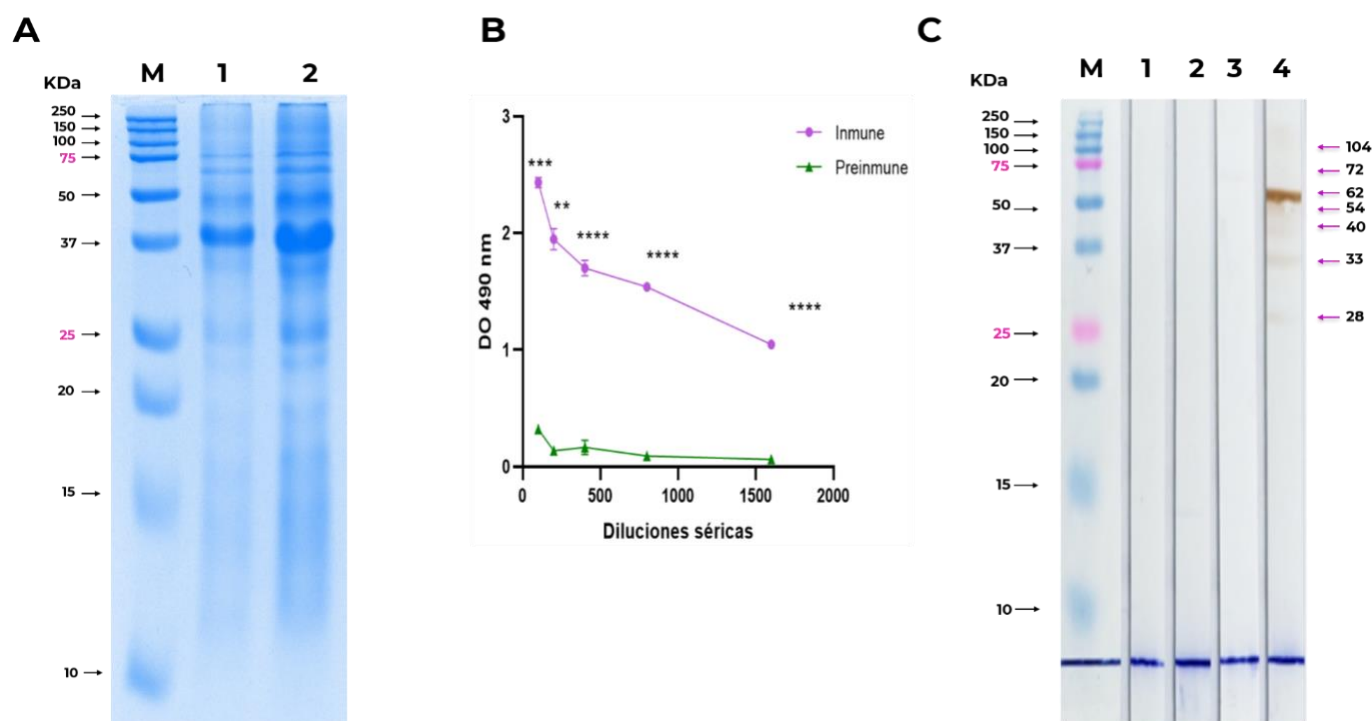


Figura 1. Inmunoquímica de *Porphyromonas gingivalis*. A. Perfil proteico con 15 bandas presentes en el carril 2 de la muestra con 10 µg del ECPg de 12 a 150 kDa, carril 1, 5 mg del ECPg. B. ELISA de IgG anti-ECPg, los datos corresponden a la media ± SD de tres ratones BALB/c. Las diferencias entre sueros preinmunes e inmunes fueron evaluadas mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). C. Western blot de IgG anti-ECPg. Detección de 7 bandas inmunogénicas del ECPg (28, 33, 40, 54, 62, 72 y 104 kDa), siendo la más prominente p62, dilución de los sueros 1:100. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

diversidad de proteínas estructurales, metabólicas y asociadas a virulencia que participan en la colonización del hospedero y en la progresión de la enfermedad periodontal (Mysak et al., 2014; Xu et al., 2020). La heterogeneidad observada en el perfil proteico es consistente con estudios previos realizados en extractos bacterianos completos de *Porphyromonas gingivalis*, donde se ha documentado la presencia simultánea de proteínas de membrana externa, fimbrias, proteasas y enzimas metabólicas con capacidad para interactuar con el sistema inmune del hospedero (Franca et al., 2007; Hirai et al., 2020). Debido a que el extracto utilizado corresponde a una preparación proteica compleja obtenida a partir de cultivos completos, era esperable detectar un número elevado de bandas proteicas distribuidas en diferentes rangos de peso molecular.

La inmunización de ratones BALB/c con el extracto proteico de *Porphyromonas gingivalis* (ECPg) indujo una respuesta humoral específica de tipo IgG, la cual fue evaluada mediante ELISA indirecto empleando diluciones seriadas de los sueros obtenidos antes y después del esquema

de inmunización (Figura 1B). En todas las diluciones analizadas, los sueros inmunes presentaron valores de densidad óptica significativamente superiores a los observados en los sueros preinmunes, evidenciando el reconocimiento específico de los antígenos presentes en el ECPg. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas mostró un efecto significativo tanto del estado inmunológico (preimmune versus immune) como de la dilución sérica, así como una interacción significativa entre ambos factores (Interacción: $F(4,16)=287.4$, $p < 0.0001$; condición inmunológica: $F(1,4)=2824$, $p < 0.0001$; dilución sérica: $F(2,077,8.309)=591.6$, $p < 0.0001$). Estos resultados indican que la magnitud de la respuesta humoral dependió simultáneamente de la inmunización y de la dilución evaluada.

Las comparaciones múltiples de Sidak confirmaron diferencias significativas entre los sueros preinmunes e inmunes en todas las diluciones estudiadas. Las mayores diferencias se observaron en las diluciones más bajas, donde los sueros inmunes alcanzaron valores

promedio de densidad óptica entre 2.434 y 1.948 unidades, mientras que los sueros preinmunes mostraron valores entre 0.321 y 0.135 unidades. Aun en las diluciones más altas evaluadas, las diferencias continuaron siendo estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), demostrando la persistencia de anticuerpos específicos circulantes contra los antígenos del ECPg. Desde una perspectiva biológica, el patrón observado es consistente con una respuesta humoral secundaria caracterizada por la expansión clonal de linfocitos B específicos y la producción de anticuerpos IgG de alta afinidad. La disminución progresiva de la señal conforme aumentó la dilución sérica refleja un comportamiento dependiente de la concentración de anticuerpos, mientras que la conservación de diferencias significativas entre los grupos inmunes y preinmunes en todo el rango de diluciones confirma que la inmunización fue capaz de inducir una respuesta adaptativa prominente contra proteínas de *Porphyromonas gingivalis*. Resultados similares han sido reportados para antígenos de esta bacteria tanto en modelos experimentales como en individuos expuestos a infección periodontal (Chen et al., 1991; Franca et al., 2007). En este sentido, los resultados obtenidos respaldan la capacidad inmunogénica del extracto proteico empleado y validan el uso de los sueros generados para la identificación posterior de proteínas inmunorreactivas mediante *Western blot*. La prominente magnitud de la respuesta humoral observada después del esquema de inmunización sugiere que el ECPg contiene múltiples determinantes antigénicos capaces de evocar clones específicas de linfocitos B y promover su diferenciación a células plasmáticas productoras de IgG, observable en respuestas inmunes secundarias o de memoria (Cancro & Tomayko, 2021). La persistencia de diferencias significativas entre los grupos preinmune e inmune incluso en las mayores diluciones evaluadas indica que la inmunización generó anticuerpos con una alta afinidad y concentración suficientes para mantener el reconocimiento antigénico bajo las condiciones de alta dilución sérica evaluada. Este comportamiento ha sido descrito previamente para proteínas inmunogénicas de *Porphyromonas gingivalis*, las cuales evocan potentes respuestas humorales, tanto en modelos experimentales como en personas expuestas a enfermedad periodontal crónica (Chen et al., 1991; Franca et al., 2007). Adicionalmente, la diferencia observada entre los sueros preinmunes e inmunes confirma que las señales detectadas posteriormente en las membranas inmunorreveladas corresponden a un reconocimiento específico inducido por la inmunización y no a reactividad basal preexistente.

La respuesta humoral observada en los animales inmunizados también sugiere que los antígenos presentes en el ECPg poseen una elevada capacidad para ser procesados y presentados por células presentadoras de antígeno, promoviendo el desarrollo de mecanismos dependientes de linfocitos T cooperadores y promoviendo la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas secretoras de IgG. La magnitud de la señal detectada mediante ELISA indica que la inmunización generó una respuesta sostenida contra diversos componentes presentes en el extracto bacteriano, fenómeno que resulta congruente con la complejidad proteica observada posteriormente mediante *SDS-PAGE* y *Western blot*.

El análisis por *Western blot* reveló la existencia de siete proteínas inmunorreactivas con pesos moleculares aproximados de 28, 33, 40, 54, 62, 72 y 104 kDa (Figura 1C, Tabla 1), indicando que únicamente una fracción del repertorio proteico presente en el ECPg fue reconocida por los anticuerpos IgG inducidos durante la inmunización. La detección de múltiples proteínas inmunorreactivas coincide con observaciones previas realizadas en pacientes con periodontitis crónica y en modelos experimentales, donde se ha demostrado que la respuesta humoral frente a *Porphyromonas gingivalis* está dirigida contra diversos antígenos bacterianos simultáneamente (Chen et al., 1991; Franca et al., 2007). Este comportamiento sugiere que la inmunogenicidad de la bacteria no depende de un único determinante antigénico, sino de un conjunto heterogéneo de proteínas capaces de inducir reconocimiento inmunológico. La identificación de siete proteínas inmunorreactivas indica que la respuesta humoral evocada por el ECPg no se restringe a un solo antígeno dominante, sino que involucra el reconocimiento simultáneo de múltiples proteínas bacterianas.

Desde una perspectiva biomédica, la detección simultánea de siete proteínas inmunorreactivas pone de manifiesto que el reconocimiento del ECPg por anticuerpos IgG ocurre contra múltiples blancos moleculares. Este hallazgo coincide con la naturaleza multifactorial de la virulencia de *Porphyromonas gingivalis*, donde distintas proteínas participan de manera coordinada en procesos de adhesión, invasión tisular, obtención de nutrientes y evasión de mecanismos inmunitarios del hospedero. Esta diversidad antigénica también explica por qué la respuesta adaptativa humoral evocada contra esta bacteria también suele ser policlonal y dirigida hacia diversos determinantes antigénicos expresados durante el crecimiento bacteriano en individuos con enfermedad periodontal (Mysak et al., 2014; Xu et al., 2020).

Entre las bandas detectadas, la proteína de 62 kDa (p62) presentó de manera consistente la señal de mayor intensidad. Si bien la intensidad de una banda

Tabla 1. Identidad putativa y función de las proteínas inmunogénicas de *Porphyromonas gingivalis* detectadas en el presente estudio e identificadas empleando bases de datos bioinformáticas.

Banda	Peso molecular (kDa)		PDB*	Proteína	Función
	Experimental	Teórico			
1	104	104.81	6I9A	Gingipaina K	Hidrolasa
2	72	72.3	6IOW	Fosfotransacetilasa	Transferasa
3	62	-	-	Antígeno inmunorreactivo	Desconocida
4	54	54.4	5NF2	Fimbria Mfa1	Adhesión celular
5	40	40	-	Omp40 (PG33)	Membrana externa
6	33	33.03	6TNJ	Fimbria tipo V Mfa5	Adhesión celular
7	28	28	2R2C	Omp28	Lipoproteína de Membrana externa

*PDB (Protein Data Bank)

inmunorreactiva no constituye una medida directa de inmunogenicidad absoluta, sí refleja un mayor reconocimiento relativo por los anticuerpos presentes en los sueros analizados bajo las condiciones experimentales utilizadas. Este resultado sugiere que p62 podría corresponder a un antígeno inmunodominante dentro del repertorio proteico evaluado, lo que lo convierte en un candidato de interés para investigaciones posteriores. La relevancia de p62 radica no solamente en la intensidad del reconocimiento observado, sino también en la ausencia de una asignación clara de su identidad bioquímica, en las bases de datos consultadas. Este hallazgo es particularmente interesante debido a que estudios genómicos recientes han señalado que una porción importante de los genes codificados por *Porphyromonas gingivalis* permanece insuficientemente caracterizada (Reyes, 2021). En consecuencia, no puede descartarse que p62 corresponda a una proteína descrita previamente, cuyo comportamiento electroforético difiera de lo observado bajo las condiciones experimentales desarrolladas aquí, o bien puede tratarse de un antígeno poco estudiado, pero con una participación relevante en la interacción hospedero-patógeno. La intensa inmunoreactividad observada justifica su consideración como un candidato prioritario para investigaciones futuras orientadas a determinar su identidad molecular y su relevancia biomédica.

IDENTIFICACIÓN PUTATIVA DE LOS INMUNÓGENOS

La comparación de los pesos moleculares experimentales con registros disponibles en las bases de datos Protein Data Bank (PDB), UniProt y NCBI Protein permitió proponer una identidad putativa para varias de las proteínas inmunorreactivas detectadas. De acuerdo con este análisis, las bandas de aproximadamente 33, 54 y 72 kDa podrían corresponder a la fimbria tipo V Mfa5, la fimbria Mfa1 y la fosfotransacetilasa, respectivamente (Hall et al., 2018; Yoshida et al., 2019; Heidler et al., 2021). Adicionalmente, otras bandas mostraron correspondencia con proteínas previamente descritas en *Porphyromonas gingivalis*, incluyendo Omp28, Omp40 y Gingipaina K (Hiratsuka et al., 1992; Slakeski et al., 2002; Guevara et al., 2019).

Las proteínas propuestas poseen funciones biológicas compatibles con mecanismos relevantes para la virulencia bacteriana (Lunar & Cascales, 2021). La presencia de proteínas relacionadas con la adhesión, como las fimbrias Mfa1 y Mfa5, resulta particularmente relevante debido a que la adherencia al biofilm subgingival constituye uno de los primeros eventos en el establecimiento de la colonización e infección periodontal (Hall et al., 2018). Asimismo, la detección de la Gingipaina K como inmunógeno, es consistente con la participación central que estas proteasas tienen en la

degradación de proteínas del hospedero, obtención de nutrientes y modulación de la respuesta inmune (Hirai et al., 2020; Nobre dos Santos-Lima et al., 2020; Lunar & Cascales, 2021). Por otra parte, la identificación putativa de la fosfotransacetilasa sugiere que estas proteínas metabólicas intracelulares también podrían participar como inmunógenos cuando son liberadas durante procesos de crecimiento, lisis bacteriana o liberación de vesículas de membrana externa, fenómeno descrito previamente en bacterias Gram negativas (Yoshida et al., 2019; Xu et al., 2020; Lunar & Cascales, 2021).

La concordancia observada entre los pesos moleculares experimentales y los valores reportados para proteínas previamente caracterizadas en *Porphyromonas gingivalis* proporciona una aproximación inicial para interpretar la naturaleza biológica de los inmunógenos detectados. Aunque el peso molecular por sí solo no constituye una prueba definitiva de identidad proteica, este criterio ha sido utilizado históricamente como una herramienta preliminar para orientar estudios posteriores de caracterización molecular (Mann et al., 2001). Por ello, es importante señalar que la asignación realizada en este estudio debe considerarse estrictamente como una identificación putativa. El criterio utilizado se fundamenta en la correlación entre el peso molecular experimental y la información disponible en bases de datos bioinformáticas, por lo que no constituye una identificación proteómica definitiva. Consecuentemente, la identidad de estas proteínas deberá ser confirmada mediante metodologías complementarias en estudios futuros.

Particularmente relevante resulta la proteína p62, para la cual no fue posible establecer una correspondencia confiable con proteínas previamente caracterizadas mediante las estrategias de identificación empleadas. Esta limitación, lejos de disminuir su importancia, incrementa el interés biológico de este inmunógeno, ya que su caracterización podría aportar información valiosa acerca de componentes antigénicos de *Porphyromonas gingivalis* que aún no han sido descritos o que permanecen insuficientemente estudiados dentro del proteoma de este microorganismo (Reyes, 2021). Considerando que una proporción importante de las proteínas expresadas por *Porphyromonas gingivalis* continúa sin una caracterización funcional completa, la ausencia de una identificación concluyente para p62 pone de manifiesto la necesidad de profundizar en su análisis mediante estrategias proteómicas y genómicas complementarias que permitan establecer con precisión su identidad molecular, localización subcelular y posible participación en los procesos de virulencia y adaptación bacteriana.

Un aspecto particularmente significativo es que p62 constituyó el inmunógeno que presentó la mayor intensidad de reconocimiento en los ensayos inmunológicos realizados, lo que sugiere que corresponde a una proteína altamente inmunogénica y consistentemente reconocida por la respuesta humoral del hospedero. La magnitud de esta reactividad indica que dicho antígeno podría desempeñar un papel relevante durante el establecimiento o la persistencia de la infección periodontal, ya sea por su elevada expresión durante determinadas etapas del proceso infeccioso, por su accesibilidad al sistema inmunológico o por la presencia de epítomos con alta capacidad para inducir el reconocimiento por anticuerpos específicos. En este contexto, la elevada inmunogenicidad observada respalda la hipótesis de que esta proteína participa de manera importante en la interacción hospedero-patógeno, constituyendo un componente antigénico de interés para investigaciones posteriores.

Desde una perspectiva funcional, la identificación precisa de p62 podría contribuir significativamente a comprender con mayor profundidad los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre *Porphyromonas gingivalis* y el sistema inmunológico del hospedero. La determinación de su secuencia, estructura tridimensional, localización celular y función biológica permitiría establecer si este inmunógeno participa directamente en procesos asociados con la adhesión bacteriana, la colonización de los tejidos periodontales, la obtención de nutrientes, la evasión de la respuesta inmune o la modulación de procesos inflamatorios, mecanismos ampliamente reconocidos como determinantes en la patogénesis de la periodontitis. De igual manera, su caracterización favorecería la incorporación de nuevos componentes al repertorio de antígenos conocidos de *Porphyromonas gingivalis*, ampliando el conocimiento disponible sobre la biología molecular de este importante patógeno periodontal.

Asimismo, la elevada inmunorreactividad observada posiciona a p62 como un biomarcador potencial de exposición inmunológica y como un candidato prioritario para el desarrollo de herramientas diagnósticas basadas en el reconocimiento serológico. La incorporación de proteínas altamente inmunogénicas en plataformas diagnósticas puede incrementar la sensibilidad y especificidad de los métodos destinados a detectar la respuesta inmunológica frente a *Porphyromonas gingivalis*, particularmente cuando dichos antígenos son reconocidos de forma consistente por individuos expuestos al microorganismo. En consecuencia, futuros estudios dirigidos a la purificación, secuenciación e identificación definitiva de esta proteína, así como a la evaluación de su comportamiento

inmunológico en cohortes más amplias de pacientes con diferentes grados de enfermedad periodontal, permitirán establecer con mayor precisión su utilidad como biomarcador, blanco diagnóstico o incluso como posible candidato antigénico para estrategias inmunoprolácticas. En conjunto, estos hallazgos sustentan que p62 representa uno de los inmunógenos más relevantes identificados en el presente estudio y justifican plenamente la realización de investigaciones adicionales encaminadas a esclarecer su identidad, función biológica y potencial aplicación clínica.

PREDICCIÓN ESTRUCTURAL DE LA OMP40

Con el fin de respaldar la identificación putativa de la proteína inmunorreactiva de aproximadamente 40 kDa, como la proteína de membrana externa de 40 kDa (Omp40) (Hiratsuka et al., 1992; Namikoshi et al., 2003), se realizó la predicción de su estructura tridimensional mediante AlphaFold 3. El modelo obtenido presentó un plegamiento caracterizado por un dominio β predominante, constituido principalmente por láminas β antiparalelas organizadas en una arquitectura compacta compatible con proteínas localizadas en la membrana externa de bacterias Gram negativas tipo barril- β (Figura 2E).

La representación coloreada de acuerdo con el índice pLDDT evidenció que la mayor parte del dominio estructurado presentó valores superiores a 90 (color azul oscuro), indicando una muy alta confianza en la predicción local del modelo. Algunas regiones periféricas y segmentos tipo bucle mostraron valores intermedios (cian y amarillo), mientras que los extremos amino y carboxilo terminales presentaron valores bajos de confianza (naranja), lo que sugiere una mayor flexibilidad conformacional o la posible presencia de regiones intrínsecamente desordenadas.

El análisis de la matriz Predicted Aligned Error (PAE) mostró valores bajos de error esperado dentro de cada dominio estructural, reflejados por la coloración verde oscuro a lo largo de la diagonal principal de la matriz. En contraste, las regiones localizadas fuera de la diagonal presentaron valores ligeramente superiores, indicando una incertidumbre moderada en la orientación relativa entre algunos dominios flexibles, sin afectar la confiabilidad del plegamiento local de la proteína.

El modelo presentó un Predicted Template Modeling score (pTM) de 0.54, valor que indica una confianza global moderada en la orientación espacial entre dominios, aunque compatible con un modelo estructural útil para el análisis funcional y la interpretación de las regiones inmunogénicas. En

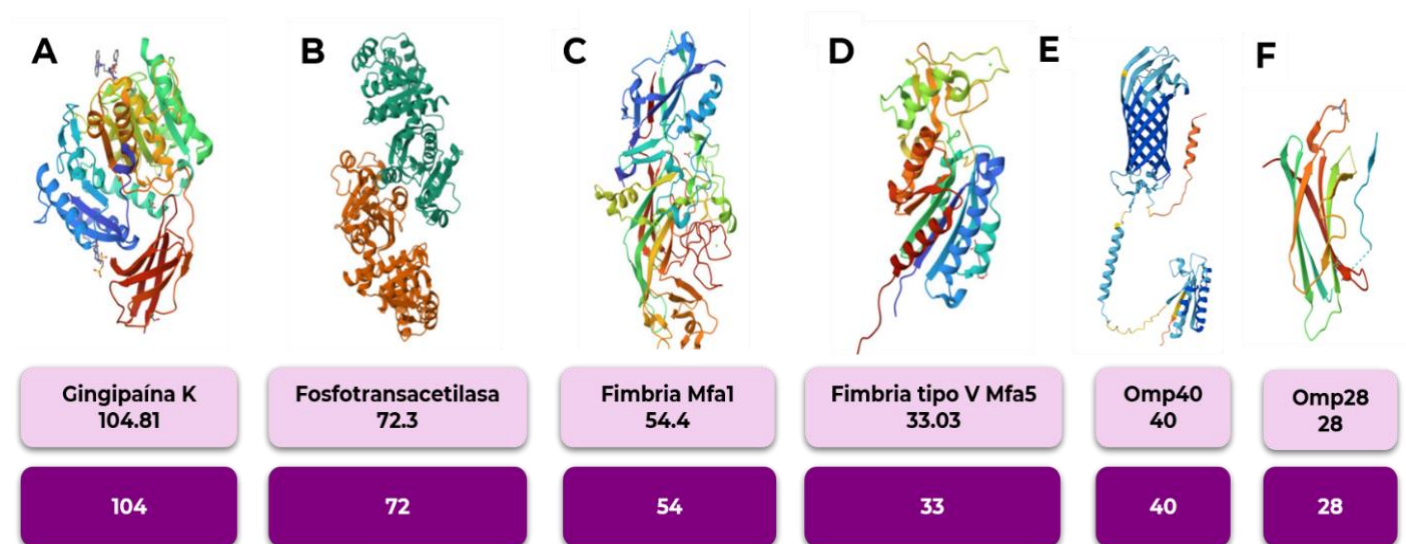


Figura 2. Identificación putativa de los inmunógenos de *Porphyromonas gingivalis*. En A-D y F. Estructuras cristalográficas; E, modelado 3D con AlphaFold, correspondientes a seis de los 7 inmunógenos detectados en el ECPg en este estudio, exceptuando a p62 de la cual se desconoce su secuencia de aminoácidos. Rectángulos rosas, nombre y peso molecular (PM en kDa) de la proteína de *Porphyromonas gingivalis* reportado en las bases de datos (PDB, Uniprot y NCBI Protein); rectángulos morados, PM experimental, estimados con el software PD Quest (Bio-Rad).

conjunto, estos resultados respaldan que la proteína presenta un núcleo estructural altamente confiable, mientras que las regiones de menor confianza probablemente corresponden a segmentos flexibles expuestos al solvente, potencialmente involucrados en procesos de reconocimiento molecular o interacción con el hospedero. Desde una perspectiva inmunológica, las regiones estructuralmente flexibles y expuestas al solvente identificadas en el modelo constituyen candidatos plausibles para contener epítomos conformacionales accesibles al reconocimiento de anticuerpos (Cancro & Tomayko, 2021). Aunque esta hipótesis requiere validación experimental, el análisis estructural *in silico* proporciona una base conceptual útil para interpretar la inmunorreactividad observada contra esta proteína, y para orientar a futuros estudios dirigidos a la identificación precisa de sus determinantes antigénicos o epítomos.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación del presente estudio es que la identidad de las proteínas inmunorreactivas fue propuesta mediante correlación de los pesos moleculares experimentales con la información disponible en las bases de datos bioinformáticas y análisis estructural *in silico*, sin emplear metodologías proteómicas de identificación directa. Por lo tanto, las asignaciones realizadas deben considerarse putativas. Sin embargo, el enfoque empleado permitió identificar proteínas inmunogénicas relevantes de *Porphyromonas gingivalis* y establecer una base sólida para estudios posteriores enfocados a la validación molecular de la identidad bioquímica y funcional de estos inmunógenos.

CONCLUSIONES

El análisis inmunoquímico del extracto proteico crudo de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (ECPg) permitió identificar quince bandas proteicas, de las cuales siete de esas proteínas (28, 33, 40, 54, 62, 72 y 104 kDa) fueron reconocidas por anticuerpos del isotipo IgG producidos en ratones BALB/c inmunizados con el ECPg. Estos resultados demuestran que el extracto contiene múltiples inmunógenos capaces de evocar una respuesta humoral antígeno-específica.

La integración de técnicas inmunoquímicas y herramientas bioinformáticas permitió proponer la identidad putativa de seis proteínas inmunorreactivas asociadas a procesos de adhesión, metabolismo y virulencia bacteriana. Entre ellas, sobresalen Omp28, Omp40, Mfa5, Mfa1, fosfotransacetilasa y Gingipaina K. La proteína p62 representó el principal hallazgo del estudio

debido a que presentó la inmunorreactividad más prominente y no pudo ser asociada de manera confiable con proteínas previamente caracterizadas.

En conjunto, estos resultados amplían el conocimiento del repertorio antigénico de *Porphyromonas gingivalis* y proporcionan una base experimental para futuros estudios dirigidos a la caracterización molecular y funcional de sus inmunógenos, así como para explorar su potencial aplicación en el desarrollo de herramientas diagnósticas o terapéuticas en enfermedades periodontales causadas por *Porphyromonas gingivalis*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la FCQB, UAS por el soporte técnico brindado.

DECLARACIÓN DE USO DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL

Durante la preparación de este manuscrito se emplearon herramientas de inteligencia artificial generativa como apoyo para la edición del texto, corrección de estilo, revisión lingüística y mejora de la claridad expositiva. Adicionalmente, se utilizó la plataforma AlphaFold 3 para la predicción *in silico* de estructuras tridimensionales de proteínas seleccionadas de *Porphyromonas gingivalis*. El uso de estas herramientas se limitó al apoyo en la elaboración y análisis complementario del manuscrito; la concepción del estudio, el diseño experimental, la obtención y análisis de los datos, la interpretación biológica de los resultados y las conclusiones científicas fueron realizados por los autores, quienes asumen plena responsabilidad sobre el contenido final del trabajo.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA

El proyecto DCB 2023-1 Identificación de proteínas antigénicas en el inmunoproteoma de *Porphyromonas gingivalis* del cual derivó este trabajo fue avalado por el H. Comité de Investigación y Ética del Posgrado en Ciencias Biomédicas, UAS.

REFERENCIAS

Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D.,

- Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Cancro, M. P., & Tomayko, M. M. (2021). Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. In *Immunological Reviews*. John Wiley and Sons Inc. 303 (1), 72–82. <https://doi.org/10.1111/imr.13016>
- Chen, C.-K. C., Denardin, A., Dyer, D. W., Genco, R. J., & Neiders, M. E. (1991). Human Immunoglobulin G Antibody Response to Iron-Repressible and Other Membrane Proteins of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis. *Infection and Immunity*. 59 (7), 2427–2433. <https://doi.org/10.1128/iai.59.7.2427-2433.1991>
- Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., & Van De Vorstenbosch, C. (2001). A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *Journal Of Applied Toxicology* 21: 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>
- Franca, M., Moura-Costa, L., Meyer, R. J., Trindade, S. C., Da, U., Tunes, R., & Freire, S. M. (2007). Humoral immune response to antigens of Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 in chronic periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*. 15(3), 213–219. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572007000300011>
- González, P., Beltrán-López, E., & López-Moreno H.S. (2024). Cloning and recombinant expression of the Immunoglobulin-like variable domains of humans PD-1 and PD-L1 immunoreceptors. *QUIBIOUAS Revista De Ciencias Químico Biológicas*, 2,1–10. <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/article/view/598>
- Guevara, T., Rodríguez-Banqueri, A., Lasica, A. M., Ksiazek, M., Potempa, B. A., Potempa, J., & Gomis-Rüth, F. X. (2019). Structural determinants of inhibition of Porphyromonas gingivalis gingipain K by KYT-36, a potent, selective, and bioavailable peptidase inhibitor. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41354-3>
- Hall, M., Hasegawa, Y., Yoshimura, F., & Persson, K. (2018). Structural and functional characterization of shaft, anchor, and tip proteins of the Mfa1 fimbria from the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20067-z>
- Heidler, T. V., Ernits, K., Ziolkowska, A., Claesson, R., & Persson, K. (2021). Porphyromonas gingivalis fimbrial protein Mfa5 contains a von Willebrand factor domain and an intramolecular isopeptide. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01621-w>
- Hirai, K., Yamaguchi-Tomikawa, T., Eguchi, T., Maeda, H., & Takashiba, S. (2020). Identification and Modification of Porphyromonas gingivalis Cysteine Protease, Gingipain, Ideal for Screening Periodontitis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01017>
- Hiratsuka, K., Abiko, Y., Hayakawa, M., Ito, T., Sasahara, H., & Takiguchi, H. (1992). Role of Porphyromonas gingivalis 40-kDa Outer Membrane Protein in the aggregation of P. gingivalis vesicles and Actinomyces viscosus. *Archives of oral biology*, 37(9), 717–724. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(92\)90078-m](https://doi.org/10.1016/0003-9969(92)90078-m)
- López-Moreno, H.S., Correa, D., Laclette, J.P., & Ortiz-Navarrete, V.F. (2003). Identification of CD4 + T cell epitopes of Taenia solium paramyosin. In *Parasite Immunology*. 25(10), 513–516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2003.00658.x>
- Lunar, I., & Cascales, E. (2021). Molecular Strategies Underlying Porphyromonas gingivalis Virulence. In *Journal of Molecular Biology*. Academic Press. 433 (7). 166836. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166836>
- Mann, M., Hendrickson, R. C., & Pandey, A. (2001). Analysis of Proteins and Proteomes By Mass Spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. 70:437–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.437>
- Messina, B. M., Grippaudo, C., Polizzi, A., Blasi, A., & Isola, G. (2025). The Key Role of Porphyromonas gingivalis in the Pathogenesis of Periodontitis Linked with Systemic Diseases. In *Applied Sciences (Switzerland)* 15(12). 6847. <https://doi.org/10.3390/app15126847>
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., & Duskova, J. (2014). Porphyromonas gingivalis: Major periodontopathic pathogen overview. *Journal of Immunology Research*. Hindawi Publishing Corporation. 476068. <https://doi.org/10.1155/2014/476068>
- Namikoshi, J., Otake, S., Maeba, S., Hayakawa, M., Abiko, Y., & Yamamoto, M. (2003). Specific antibodies induced by nasally administered 40-kDa outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis inhibits coaggregation activity of P. gingivalis. *Vaccine*, 22(2), 250–256. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00576-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00576-0)
- Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its

- Surveillance. *Scientific World Journal*. 2146160. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>
- Nobre dos Santos-Lima, E. K., Araújo Paiva Andrade Cardoso, K., Mares de Miranda, P., Cirino de Carvalho-Filho, P., Passos Rocha, T., Ferreira de Moura-Costa, L., Olczak, T., Miranda Lopes Falcão, M., Gomes-Filho, I. S., Meyer, R., Tosta Xavier, M., & Castro Trindade, S. (2020). Novel synthetic peptide derived from Porphyromonas gingivalis Lys-gingipain detects IgG-mediated host response in periodontitis. *Anaerobe*, 61. 102140. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102140>
- Oliva, L. E. R., Najera, R. I. S., Zavala, C. E. del P. S. M., Ancona, P. E. L., Elizondo, J. E., Rangel, S. S., Regalado, S. E. F., & Soto, J. M. S. (2022). Porphyromonas: A dental approach. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 8(2), 213–216. <https://doi.org/10.22271/oral.2022.v8.i2d.1510>
- Piedra-Quintero, Z. L., Apodaca-Medina, A. I., Beltrán-López, E., León-Sicairos, C. R., Chávez-Ontiveros, J., Rendón-Maldonado, J. G., Ortiz-Navarrete, V. F., & López-Moreno, H. S. (2015). Immunoproteomic Identification of p29 Antigen as the Elongation Factor-1 α of Leishmania mexicana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(7), 449–452. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1712>
- Reyes, L. (2021). Porphyromonas gingivalis. In *Trends in Microbiology* (Vol. 29, Number 4, pp. 376–377). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.010>
- Sanchez, A. A., Moyeda, A. L. G., Ibarra, K. I. J., Pascual, J. B., Rodríguez, D. L., Salazar, V. I. Q., Villarreal, C. A. A., & Soto, J. M. S. (2022). Porphyromonas gingivalis, an Orthodontic point of view. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 8(4), 82–87. <https://doi.org/10.22271/oral.2022.v8.i4b.1629>
- Siemińska, K., Cierpisz, P., Śmiga, M., & Olczak, T. (2021). Porphyromonas gingivalis hmuY and bacteroides vulgatus buu—a novel competitive heme acquisition strategy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22052237>
- Slakeski, N., Margetts, M., Moore, C., Czajkowski, L., Barr, I. G., & Reynolds, E. C. (2002). Characterization and expression of a novel Porphyromonas gingivalis outer membrane protein, Omp28. *Oral Microbiology Immunology*, 17, 150–156., 105–115. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630105>
- Villa-Medina, M. C., Díaz-Gaxiola, C., Rosales-Reyes, R., Durán-Pérez, S. A., Vega-Castillo, U., Rodríguez-Rochín, J. A., León-Sicairos, C. del R., Beltrán-López, E., & López-Moreno, H. S. (2025). Cloning and Recombinant Expression of the Caspase-Activated DNase Orthologous Gene of Giardia lamblia. *BioMed Research International*, 3420875. <https://doi.org/10.1155/bmri/3420875>
- Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 120, 45–84. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>
- Yoshida, Y., Sato, M., Nonaka, T., Hasegawa, Y., & Kezuka, Y. (2019). Characterization of the phosphotransacetylase-acetate kinase pathway for ATP production in Porphyromonas gingivalis. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1588086>