

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA DE CÉLULAS  
ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANA FRENTE A *Porphyromonas*  
*gingivalis* W83 ENTRE UN MODELO DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL Y UNO  
BIDIMENSIONAL

Andrés Felipe Cardona Mendoza



Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Maestría en Ciencias Biológicas con énfasis en Inmunología

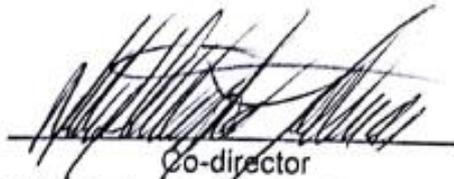
Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencias Biológicas  
Bogotá. D.C  
Junio 2018

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA DE CÉLULAS  
ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANA FRENTE A *Porphyromonas*  
*gingivalis* W83 ENTRE UN MODELO DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL Y UNO  
BIDIMENSIONAL

Andrés Felipe Cardona Mendoza



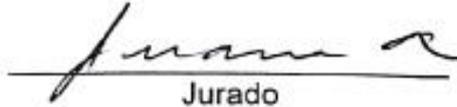
Director  
Dr. Diego Fernando Guallero Escobar MSc,cPhD.  
Profesor Titular  
Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO  
Universidad El Bosque



Co-director  
Dra. Nelly Stella Roa Molina DDs, Msc, PhD.  
Profesor Asociado  
Centro de Investigaciones Odontológicas  
Pontificia Universidad Javeriana

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencias Biológicas  
Bogotá. D.C  
Junio de 2018

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA DE CÉLULAS  
ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANA FRENTE A *Porphyromonas*  
*gingivalis* W83 ENTRE UN MODELO DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL Y UNO  
BIDIMENSIONAL



Jurado

Dra Juanita Angel

MSc en Biotechnologie anticorps et recepteurs cellulaires

PhD en Biologie Cellulaire

Profesor Titular

Facultad de Medicina

Pontificia Universidad Javeriana



Jurado

Dra Lina Suarez

Periodoncista,

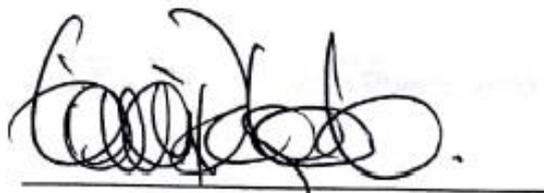
Msc en Ciencias Biológicas

Profesor Titular

Universidad Nacional de Colombia

Profesor Asistente

Pontificia Universidad Javeriana



Jurado

Dr. Felix Giovanni Delgado Tiria

MSc en Bioquímica

PhD en Inmunología

Profesor Asociado

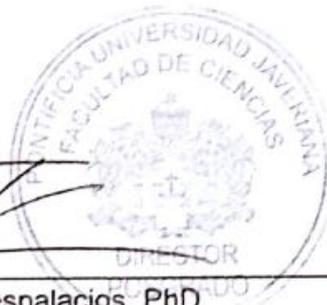
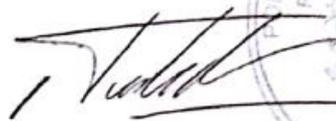
Instituto de Virología

Vicerrectoría de Investigaciones

Universidad El Bosque

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA DE CÉLULAS  
ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANA FRENTE A *Porphyromonas*  
*gingivalis* W83 ENTRE UN MODELO DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL Y UNO  
BIDIMENSIONAL

Andrés Felipe Cardona Mendoza



---

Alba Alicia Trespalacios, PhD  
Directora de Posgrado  
Facultad de Ciencias  
Pontificia Universidad Javeriana



---

Concepción Judith Puerta, PhD  
Decana  
Facultad de Ciencias  
Pontificia Universidad Javeriana

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencias Biológicas  
Bogotá. D.C  
Junio de 2018

## Nota de Advertencia

Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

## Tabla de Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Endotelio vascular: de la función a la disfunción endotelial.....	4
2.2 Aterosclerosis y su asociación con periodontopatógenos .....	5
2.3 Modelos de cultivo celular 3D y diferencias en la respuesta de células endoteliales con los modelos de cultivos 2D convencionales .....	9
2.4 Modelos In Vitro para el estudio de la respuesta celular pro-aterosclerótica inducida por periodontopatógenos .....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	13
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	14
4.1.1 Preparación de soportes de colágeno I .....	14
4.1.2 Cultivo bacteriano.....	14
4.1.3 Cultivo y mantenimiento de células endoteliales de arteria coronaria humana(HCAEC): .....	14
4.1.4 Preparación de inóculo de <i>P. gingivalis</i> W83 viva.....	15
4.1.5 Infección de las HCAEC con <i>P. gingivalis</i> W83 viva o su control.....	16
4.1.6 Cuantificación de la expresión génica de eNOS, COX-2 y vWF en las HCAEC en los cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales .....	16
4.1.8 Cuantificación de los niveles de Tromboxano A2 y Prostaglandina I2 producidos por las HCAEC en los cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales .....	18
4.1.9 Análisis de la Información.....	18
<b>5. RESULTADOS</b> .....	19
5.1 Expresión de genes asociados a la función COX-2, eNOS y factor von Willebrand (vWF) en HCAEC frente a <i>P. gingivalis</i> W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional.....	19
5.2 Niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ IL-6 y TNF $\alpha$ ), y quimiocinas (RANTES, MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ e IL 8) producidas por HCAEC frente a <i>P. gingivalis</i> W83 en los modelos de cultivo celular de estudio.....	25
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	42
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	43

# COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA CORONARIA HUMANA FRENTE A *Porphyromonas gingivalis* W83 ENTRE UN MODELO DE CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL Y UNO BIDIMENSIONAL

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares son un método ampliamente utilizado en diferentes campos de la investigación, desarrollados para estudiar el comportamiento celular de forma *in vitro*, de esa manera, sirven para tener las primeras aproximaciones a nivel celular y molecular de procesos normales y/o patogénicos. Estos sistemas cobran gran importancia para el estudio de mecanismos de acción de patógenos sobre poblaciones celulares específicas, convirtiéndose en un escenario altamente controlado para este fin.

Los cultivos celulares tradicionalmente se han realizado sobre superficies planas plásticas en dos dimensiones o bidimensionales (2D), ya sea en monocapas o en suspensión. Aunque los cultivos celulares 2D ofrecen ventajas en tiempo y manipulación de células, se han venido reconociendo limitaciones importantes en este modelo de cultivo celular como lo son, el no simular las condiciones naturales que ellas tienen *in vivo*; en general, las células están rodeadas de una Matriz Extracelular (MEC) que les proporciona y permite en un ambiente tridimensional (3D), recibir características particulares que condicionan su comportamiento (1).

Desde finales de los años 60's se han venido desarrollando modelos de cultivo celular 3D, los cuales adicionan soportes de diferentes materiales biológicos o sintéticos que cumplen la función de MEC, siendo el colágeno el material biológico más utilizado (2). Los cultivos celulares 3D ofrecen condiciones que simulan mejor el microambiente tisular, debido a que se establecen interacciones célula-célula, características de crecimiento/proliferación, morfología, exposición al medio (nutrientes), expresión génica y producción de citocinas diferentes, respecto a los cultivos celulares 2D (1). Aunque siguen siendo un modelo limitado en las aproximaciones fisiológicas y anatómicas de los tejidos, los cultivos celulares tridimensionales 3D representan un avance para el mejoramiento de los cultivos celulares y con esto, el de los modelos *in vitro*.

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es una bacteria anaerobia Gram negativa, considerada como un patógeno oral asociado a la periodontitis crónica y en los últimos años se ha visto asociada a diferentes patologías sistémicas, entre ellas la aterosclerosis (3-5). Este patógeno, tiene la capacidad de pasar al torrente sanguíneo luego de actividades de

higiene oral común (cepillado y uso de seda dental) y/o tratamientos periodontales (6,7), los cuales generan procesos de bacteriemias transitorias, permitiendo su llegada a través de diferentes mecanismos al endotelio vascular aórtico (3), en donde ha sido aislada viable de placas ateromatosas humanas (8). *P. gingivalis* no se ha establecido como un agente causal de la aterosclerosis, sino como un factor que promueve inflamación y por tanto se asocia a procesos de disfunción endotelial que conducen al desarrollo de la placa aterosclerótica (9).

La adherencia, la capacidad invasiva, y otros factores de virulencia, le permiten a *P. gingivalis* ejercer un efecto nocivo sobre las células del endotelio vascular aórtico, que si bien no son fuertes, induce procesos de activación endotelial caracterizados por el aumento de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , quimioattractantes como MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , RANTES e IL-8 (4) y en la expresión de moléculas de adhesión. Esta respuesta celular inflamatoria puede conducir a la disfunción del endotelio que se caracteriza por un estado pro-inflamatorio, protrombótico y un aumento de la vasodilatación, que en conjunto, puede promover al reclutamiento, adhesión y transmigración de monocitos a las células endoteliales, eventos inmunológicos característicos de la aterosclerosis (5,10, 11). Dentro de las cepas de *P. gingivalis* que se ha evidenciado en un modelo *in vitro* que tienen efectos de adhesión, persistencia e inducción de respuesta inflamatoria sobre Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC), están: 33277, A7436, 381 y W83, siendo esta última una de las más virulentas (4).

En el endotelio vascular (EV) que está constituido por la adventicia, la media y la íntima, las células endoteliales forman una monocapa sobre una MEC tridimensional constituida principalmente por colágeno tipo I y otros proteoglicanos que conforman la íntima endotelial (12). El papel de las células endoteliales es crítico en el mantenimiento funcionamiento del EV, por tanto, el estudio tanto de los factores como de los mecanismos que las afectan y consecuentemente el EV que estén involucrados en los procesos de disfunción endotelial son de gran importancia.

En la actualidad, los modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos de virulencia de *P. gingivalis* sobre células endoteliales se han realizado en cultivos celulares bidimensionales 2D y/o con Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC) (4, 12-15), condiciones que no asemejan al contexto real en el que se encuentra la célula endotelial aórtica. Hasta el momento, no se han estudiado los efectos de *P. gingivalis* sobre la respuesta inflamatoria de HCAEC en un modelo de cultivo celular 3D con matrices colágenas que simule mejor *in vitro* las condiciones fisiológicas dentro de las que se llevan a cabo estos eventos. Por tanto, surge la pregunta de investigación: ¿Cuáles son las diferencias en la respuesta pro-inflamatoria de

HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 viva, entre un sistema de cultivo tridimensional sobre matrices de colágeno, respecto a los cultivos bidimensionales? Se planteó la hipótesis que la respuesta pro-inflamatoria de las HCAEC frente a *P. gingivalis* viva en el modelo de cultivo celular tridimensional es menor que en el modelo de cultivo bidimensional tradicional.

Este proyecto tiene como finalidad aportar al entendimiento de la respuesta inflamatoria de células endoteliales inducida por *P. gingivalis* en un modelo de cultivo 3D, que nos conduzcan a una mejor comprensión de los procesos de disfunción endotelial relacionados con la aterosclerosis y los periodontopatógenos que hasta ahora son conocidos a partir de los modelos de cultivo celular convencionales 2D. La evaluación de la respuesta inflamatoria inducida por *P. gingivalis* viva en células endoteliales se realizó a partir del modelo 3D desarrollado y caracterizado en una tesis doctoral desarrollada en el laboratorio de biotecnología de la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque. Este trabajo se realizó dentro del proyecto titulado “*Efecto de soportes de colágeno en un modelo de cultivo endotelial tridimensional (3D) en la respuesta inducida por Porphyromonas gingivalis*”, el cual fue financiado por Colciencias, la universidad El Bosque y la universidad Nacional de Colombia.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Endotelio vascular: de la función a la disfunción endotelial

El endotelio vascular (EV) es uno de los principales órganos del cuerpo humano que recubre la zona interna de los vasos sanguíneos y está constituido principalmente por 3 capas: adventicia, media e íntima. La adventicia es la capa más externa de los vasos sanguíneos y está constituida principalmente por tejido conectivo; la media está caracterizada por la presencia de células de músculo liso la cual le provee soporte al vaso sanguíneo además de elasticidad; la íntima es una red compleja de componentes de MEC conformados por colágeno y proteoglicanos sobre la cual se ubica una extensa monocapa de células endoteliales (CEs) unidas entre sí por moléculas de adhesión formando uniones estrechas y uniones adherentes, que constituyen el endotelio vascular y que recubre directamente la luz del vaso sanguíneo (16). La interacción entre las CEs y la MEC es compleja, por una parte las CEs están involucradas en la biosíntesis de la MEC, en parte regulado por el TGF- $\beta$ , produciendo diferentes proteínas que la constituyen principalmente laminina, además de colágeno tipo IV que es importante para mantener la estabilidad del endotelio y un estado ateroprotectivo, y otras proteínas accesorias como el perlecano, el nidógeno y el colágeno tipo XVIII (entre otras) que conforman la lámina basal (conformada por la láminas lúcida y densa) y la lámina reticular, rica en colágeno tipo I, en la cual se desarrollan las CEs. Por otra parte, la MEC condiciona el desarrollo de las CEs como por ejemplo en los procesos de morfogénesis, señalización, migración, proliferación y supervivencia (17, 18), de esta forma se hace evidente la importancia de estudiar el comportamiento de las CEs en interacción directa con la MEC y no de manera aislada como se ha hecho hasta el momento en los modelos convencionales de cultivo celular 2D.

El EV es versátil y posee diversas funciones como la regulación tanto de la trombosis, trombolisis y la adhesión plaquetaria, así como la modulación del tono vascular, el flujo sanguíneo y las respuestas inmunes inflamatorias (19). La modulación o el mantenimiento del tono vascular está mediado principalmente por el óxido nítrico (ON) el cual activa la guanilato ciclasa en las células de músculo liso, induciendo de esta forma vasodilatación a través del guanosín monofosfato cíclico (cGMP, por sus siglas en inglés) (20). La prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) que deriva principalmente de la acción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el metabolismo del ácido araquidónico también es conocida por modular el tono vascular por vías tanto dependiente como independiente del adenosín monofosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés) en las células de músculo liso (21), además de ayudar junto

al ON a mantener un estado antitrombótico del EV (20) siendo el principal prostanoides inhibidor de la agregación plaquetaria, convirtiéndose así en un importante factor ateroprotector (22), ya que sumado a esto, inhibe la adhesión leucocitaria al EV y actúa como un mediador antiinflamatorio en el contexto cardiovascular (23).

El mantenimiento de la función endotelial y por ende de los genes asociados a la función endotelial es crítico para evitar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la AT que se asocia principalmente a la disfunción endotelial caracterizada por el aumento de la adhesión monocitaria y la permeabilidad vascular, además de estados proinflamatorios y protrombóticos del endotelio que pueden ser inducidos por diversos factores que insultan el endotelio vascular (11, 20). La acción de eNOS se ha propuesto como un factor ateroprotector y la alteración de su expresión se ha evidenciado que acelera los procesos aterotrombóticos en modelos murinos (24, 25) así como el incremento de tromboxano A2 (TXA2) (26), que en PA ateromatosas humanas se encuentra de igual forma aumentado y asociado a los problemas trombóticos propios de la AT (27), como la inducción de agregación plaquetaria (28). El vWF es producido principalmente por las células endoteliales y guardado en los cuerpos de Weibel-Palade en forma de homodímero, su función principal es intervenir en los procesos de adhesión plaquetaria uniéndose y estabilizando factor VIII, sirve como cofactor para la unión de plaquetas a la matrix extracelular expuesta por alguna lesión (19, 29), además de tener la capacidad de inducir reclutamiento leucocitario al endotelio, se ha visto aumentado en individuos con AT, sugiriendo otro posible factor asociado a la progresión de la enfermedad (30-32). En conjunto, las alteraciones de estos factores (entre muchos otros) ayudan a promover un estado de disfunción endotelial, que como se planteó inicialmente es la principal característica en la AT.

## 2.2 Aterosclerosis y su asociación con periodontopatógenos

La aterosclerosis (AT) es una de las principales causas de la enfermedad cardiovascular (ECV) y primer motivo de muertes en diferentes partes del mundo (33). Se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria crónica que afecta las arterias de grueso y mediano calibre, cuyo principal agente etiológico es la acumulación de lípidos, en especial de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en las paredes arteriales que lleva a la formación de la placa aterosclerótica (PA). Esta acumulación de lípidos inicialmente genera una lesión conocida como “estría grasa” la cual se puede encontrar en la primera década en la aorta, en las arterias coronarias en la segunda década, y en las arterias cerebrales en la tercera y cuarta década de vida (34). La progresión de la estría grasa que desarrolla la PA forma placas fibrosas, las cuales se

pueden agrandar, sufrir calcificaciones, hemorragias, ulceraciones y trombosis (35), y con esto generar una estenosis que puede conducir a una isquemia del músculo cardíaco y un consecuente infarto.

A pesar de que inicialmente se centraron los estudios en la acumulación de lípidos, a lo largo de los últimos 50 años se han identificado diversos factores de riesgo para la AT, los cuales se pueden agrupar en genéticos y ambientales. Dentro de los factores de riesgo genéticos se pueden encontrar diabetes, obesidad, historia familiar, síndrome metabólico, depresión y género. Entre los factores de riesgo ambientales están las dietas altas en grasas, el tabaquismo, la falta de ejercicio y los agentes infecciosos (34), entre los cuales las bacterias patógenas de la cavidad oral (periodontopatógenos) están entre las recientemente asociadas a la AT y son uno de los focos de investigación actual en la patogenia de la enfermedad (3).

La formación de la PA comienza con el depósito y acumulación de LDL en la matriz subendotelial, el cual sufre modificaciones oxidativas como resultado de su exposición a los residuos oxidativos de las células vasculares y lo convierten en LDL oxidado (LDLox) que es uno de los primeros desencadenantes de los procesos inflamatorios en la pared vascular (34). La inflamación es la característica más importante de la AT, convirtiendo a la respuesta inmune como el factor más importante del desarrollo de la enfermedad. Clásicamente, la primera respuesta inmune que se realiza es contra el LDLox, sin embargo, productos bacterianos como el LPS o citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  también inducen activación endotelial y adhesión de monocitos a dicho endotelio, que son los eventos iniciales o eventos tempranos en la patogenia de la enfermedad.

La activación endotelial se caracteriza por la expresión de proteínas de estrés como HSP60, la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y de moléculas de adhesión como ICAM-1 y V-CAM-1 sobre la superficie de las células endoteliales, además de la producción de quimiocinas como CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) y CX3CL1 (fractalquina) (36), que van a inducir la quimiotaxis de monocitos activados circulantes quienes posteriormente realizarán la adhesión celular mediada por las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio e integrinas monocitarias como LFA-1 (ligando de ICAM-1) y VLA-4 (ligando de V-CAM 1). La adhesión celular generada tras la activación del endotelio, va a permitir el rolling, adhesión y posterior diapedesis de los monocitos al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos y empiezan a endocitar los lípidos allí acumulados, los cuales cuando están en pequeñas cantidades son eliminados por los macrófagos, controlando el proceso inflamatorio, en contraste, cuando los lípidos están acumulados en

grandes cantidades, los macrófagos se llenan de estas moléculas formando células espumosas (34).

La formación de células espumosas también puede ser estimulada por LPS, el cual tras ser reconocido por los receptores tipo toll (TLR2 o TLR4) de los macrófagos, se induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , que mantiene el estímulo para la activación del endotelio, y conduce al reclutamiento y trans migración de linfocitos que con el ambiente proinflamatorio se polarizan hacia un perfil Th1, éstos potencian y mantienen la inflamación, haciendo de ésta activación un proceso crónico (10).

La cronicidad del proceso inflamatorio, lleva a la producción de factores de crecimiento por parte de los macrófagos, linfocitos y otros leucocitos allí presentes (10), que estimulan la migración de las células del músculo liso (CML) hacia la íntima del endotelio, donde producen colágeno y un endurecimiento de la placa, efecto característico en los estados avanzados de la enfermedad. Adicionalmente, se producen metaloproteinasas de matriz (MMP) como las MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (34, 37), que al acumularse pueden romper la placa, y liberar todo su contenido al torrente sanguíneo, activándose de esa manera, el sistema de coagulación, el cual generará un estado protrombótico, que junto con la isquemia generada por el progresión de la placa, aumentarán los riesgos de un infarto agudo al miocardio. Se ha evidenciado que prostaglandinas como la PGE2 que es generada por la acción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) está involucrada en la inducción de MMP-2 y MMP-9 por parte de macrófagos presentes en PA, dejando en evidencia el papel de mediadores de la vía oxidativa del ácido araquidónico como COX-2 en los procesos ateroscleróticos, evidencia que aún es discutida y sujeta a más estudios (38). Otros factores hemostáticos claves como las plaquetas y el Factor von Willebrand (vWF, por sus siglas en inglés) han sido también asociados a los procesos ateroscleróticos en fases tardías, dónde se ha evidenciado un aumento del vWF en pacientes con enfermedades cardiovasculares como la AT (30-32).

El flujo sanguíneo (FS) es un factor clave dentro de la aterosclerosis. Las células del endotelio arterial están sometidas a una tensión tangencial de cizallamiento que se origina por la fricción del FS sobre la superficie endotelial de la pared arterial. El flujo laminar que se encuentra en las partes rectas de las arterias normalmente ejerce un efecto ateroprotector, ya que en estas regiones las células endoteliales muestran un estado quiescente, caracterizado por elevados niveles de Óxido Nítrico (ON), bajo estrés oxidativo y de moléculas de adhesión, lo cual potencia su función de barrera y le confiere un fenotipo anti-inflamatorio (36), además de esto la velocidad del FS en las partes rectas donde el flujo laminar es característico, es alta para permitir la adhesión de los monocitos al endotelio. En las zonas de fluido en disturbio,

en donde la velocidad es baja, las células endoteliales muestran bajos niveles de ON, altos niveles de estrés oxidativo, aumento tanto de la permeabilidad, como de la adhesión monocitaria y disminución de moléculas atero-protectivas como el factor similar a Kruppel-2 (KLF2) (36), lo que induce a que se desarrollen un estado proinflamatorio que hace de estos sitios los más propensos a desarrollar AT.

KLF2 es un factor de transcripción de respuesta a elevado al estrés de cizallamiento, expresado exclusivamente en el endotelio y su elevada expresión está correlacionada con atero-protección y anti-inflamación (39). Si el endotelio es sometido a elevado estrés de cizallamiento se induce aumento en la expresión del gen Sintasa de Óxido Nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) mediada por el factor KLF2. La acción tanto de KLF2 como de eNOS ha sido asociada como factores protectivos en la aterosclerosis, este último en modelos murinos (39, 40).

Los periodontopatógenos recientemente han sido asociados a la patogenia de la AT (3, 41). *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son dos de los periodontopatógenos que han sido encontradas en PA (8), lo cual las relaciona directamente con la AT. Uno de los puntos a resolver es ¿cómo una bacteria de la cavidad oral llega a una PA?; Castillo et al (18) aislaron ADN de estas y otras bacterias de la cavidad oral en sangre periférica de individuos en tratamientos periodontales, lo que sugiere que estos microorganismos pueden llegar a la PA a través de la sangre. Para *P. gingivalis* se ha planteado que puede llegar a la PA sirviéndose de los macrófagos a través del CR3 o del DC-SIGN de las Células Dendríticas (DCs), a los cuales manipula cambiando la expresión de los receptores de quimiocinas para inducir su transporte a los lugares de atero-propensión en las arterias, donde a través de su LPS puede influir con la patogenia de la AT como ya se ha descrito (3). La invasión de células de endoteliales por parte de *P. gingivalis* es uno de los principales mecanismos asociados a la disfunción endotelial generada por este periodontopatógeno, de cuyas cepas la W83 que es considerada de las más patógenas, presenta una alta invasividad y persistencia en HCAEC (4), en las cuales induce procesos inflamatorio a través de la activación de TLR-2 (42). El estudio del efecto de *P. gingivalis* en la AT ha venido cobrando importancia gracias a modelos murinos que han mostrado que este microorganismo es capaz de acelerar la formación de PA en ratones ApoE deficientes (43). Recientemente se han propuesto una serie de posibles mecanismos por medio de los cuales los periodontopatógenos pueden estar involucrados en la disfunción endotelial, en donde se plantea que a través de procesos de endotoxemias o bacteriemias se puede inducir una activación de las células endoteliales por medio de los TLRs (principalmente TLR 2 y TLR 4), llevando así a la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, quimiocinas como MCP-

1 e IL-8 y moléculas de adhesión como ICAM-1 vía NF- $\kappa$ B; conduciéndose de esta forma a una activación y reclutamiento monocitario al endotelio vascular, para posteriores procesos de rolling y diapedesis a la íntima del endotelio, donde estos monocitos se diferencian a macrófagos en los cuales se crean depósitos lipídicos caracterizándose como células espumosas (15).

El hecho que periodontopatógenos estén involucrados en la PA, hace de la periodontitis un factor de riesgo para la AT (44). El papel de los periodontopatógenos en los eventos tempranos de formación de PA aún están por determinar.

### 2.3 Modelos de cultivo celular 3D y diferencias en la respuesta de células endoteliales con los modelos de cultivos 2D convencionales

El cultivo celular ha sido una de las herramientas más importantes en la investigación de múltiples enfermedades. Clásicamente los cultivos celulares han sido desarrollados sobre superficies planas, por lo cual son bidimensionales (2D). *In vivo* la mayoría de células se encuentran rodeadas de otras células o de matriz extracelular de una forma tridimensional (3D) como en el caso de las células endoteliales, por tanto los cultivos celulares 2D son limitados e inadecuados para el estudio del comportamiento de estas células ya que no tienen en cuenta el ambiente 3D *In vivo* (1).

Uno de los principales objetivos del desarrollo de modelos de cultivos celulares 3D es tener en cuenta las condiciones naturales en las que se encuentran los diferentes tipos celulares como por ejemplo las interacciones célula-célula, el acceso a nutrientes, la forma natural en las que las células crecen y su interacción con la MEC, para de esta forma estudiar el comportamiento celular con una mayor aproximación a las condiciones *in vivo* en las que se desarrollan los diferentes eventos celulares a nivel tisular, no sólo para entender su comportamiento sino para buscar estrategias de tratamiento en diferentes patologías. Para este objetivo se han desarrollado diferentes técnicas en el desarrollo de modelos celulares 3D como los cultivos esferoides, hidrogeles, bioreactores, dispositivos de microfluídica, y el desarrollo de soportes de diferentes tipos de biopolímeros que permiten principalmente estudiar el efecto que tienen las diferentes MECs sobre el comportamiento celular (1).

Dentro de los principales componentes de las MECs sobre el cual las células endoteliales reposan se encuentra el colágeno, que sirve como una estructura de sostén con una influencia directa sobre el comportamiento biológico de la célula (45). Estudios llevados a cabo en cultivos 3D elaborados con fibroblastos orales y soportes de colágeno tipo I, mostraron que hay diferencias significativas en la

expresión de quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y de remodelación de la matriz extracelular con cultivos de fibroblastos en 2D (46), además se ha evidenciado que queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales mantienen una mayor viabilidad a estímulos de estrés en cultivos 3D respecto a los cultivos en 2D (47), y que la presencia de una MEC en los cultivos celulares es importante para simular las condiciones de proliferación, morfología, adhesión, mecanotransducción, señalización celular y remodelamiento de sustratos que las células tisulares tienen en sus ambientes fisiológicos (48), esto plantea la necesidad de estudiar el comportamiento celular en cultivos 3D. Los avances en la purificación de colágeno, han abierto las puertas para el desarrollo de dichos cultivos.

Los cultivos celulares de monocapas endoteliales que crecen sobre soportes elaborados con componentes estructurales de la vasculatura, como el colágeno, permiten estudiar a la célula endotelial en un ambiente más parecido al natural. Células endoteliales cultivadas sobre poliestireno presentan respuestas a estímulos inflamatorios diferentes a las que muestran cuando se cultivan embebidas en una matriz tridimensional de gelatina (49). Hess y colaboradores evaluaron la activación de HCAEC embebidas en matrices de colágeno con TNF- $\alpha$  vía NF- $\kappa$ B, y la compararon con la observada en cultivo 2D (50), encontraron mayor fosforilación de I $\kappa$ B-alfa y mayor concentración nuclear de p65 en el cultivo 2D que en el cultivo con MEC, además la secreción de las citocinas pro-inflamatorias MCP-1, IL-6, IL-8 y de moléculas de adhesión en el cultivo con MEC disminuyó, lo que condujo a una disminución en la adhesión de células natural killer (NK). Estos resultados indican que el sustrato de matriz extracelular modula la respuesta de la célula endotelial frente a estímulos inflamatorios.

En otro estudio realizado por Orr y colaboradores, se evidenció que células endoteliales cultivadas sobre diferentes matrices extracelulares y estimuladas por flujo, modulan la activación de NF- $\kappa$ B de manera diferente (51). Así, cuando se cultivan sobre matrices de colágeno I o laminina se observa menor translocación nuclear de p65 que cuando se cultivan sobre fibrinógeno ó fibronectina. Por el contrario, cuando los cultivos sobre colágeno I se hicieron sin flujo se incrementó la actividad nuclear de p65 y la expresión de ICAM-1. Los cultivos que se hicieron sobre colágeno IV mostraron una respuesta similar que los cultivos sobre colágeno I. Los autores sugieren que este resultado es esperado debido a que ambos tipos de colágeno ligan las mismas integrinas en la superficie celular.

Como se ha podido evidenciar el comportamiento de diferentes tipos celulares no es el mismo en los modelos de cultivo 2D que en los modelos de cultivo 3D con MEC. Por tanto más

investigación es necesaria en el contexto de los modelos de cultivo 3D simulando mejor las condiciones fisiológicas en las que los diferentes tipos celulares se encuentran.

#### 2.4 Modelos In Vitro para el estudio de la respuesta celular pro-aterosclerótica inducida por periodontopatógenos

Hasta el momento la comprensión de los mecanismos por medio de los cuales los periodontopatógenos podrían estar asociados en los procesos de disfunción endotelial y/o respuestas celulares pro-ateroscleróticas en estudios *in vitro*, se ha basado en modelos de cultivo 2D y/o utilizando células endoteliales de vena umbilical humano (HUVEC), que no simulan las condiciones ni el tipo de células endoteliales en las que se desarrollan los eventos asociados a la AT como la disfunción endotelial. A partir de estos modelos *in vitro* 2D se ha evidenciado que tanto las fimbrias de *P. gingivalis* como *P. gingivalis* inactivada por calor tienen la capacidad de inducir en HUVEC la producción de IL-8 y MCP-1, y que a su vez los niveles de estas quimiocinas son modulados por sus gingipaínas (14, 52), además que tanto *P. gingivalis* como su LPS induce la adhesión de células mononucleares a través de la activación en HUVEC de TLR 2 mediada por el aumento ICAM, VCAM y E-selectina (13, 53), respuestas celulares asociadas a la disfunción endotelial.

Los tipos celulares implementados en los estudios *In vitro* de la AT también son factores claves en la obtención de resultados de mejor comparabilidad. Las HUVEC han sido utilizadas para el estudio de la patogenia de la AT, sin embargo, existe un cultivo primario de Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) que sirven como un mejor modelo para el estudio de la patogenia de la enfermedad, la diferencia en los patrones de activación entre estos dos modelos celulares ya ha sido descrita (54); por tanto, es recomendable el uso de las HCAEC para el estudio de la AT por ser células del sitio donde comúnmente se desarrolla la enfermedad. Por otro lado, las células THP-1 son el modelo más ampliamente utilizadas en el estudio de la función y regulación de monocitos y macrófagos en el sistema cardiovascular, ya que estas células han mostrado emular de la mejor manera, las interacciones entre los monocitos y las células endoteliales en el sistema cardiovascular (55), lo cual las hace hasta el momento, el mejor tipo celular para estudiar los diferentes mecanismos que involucran a los monocitos en la AT, como la adhesión celular.

Hasta el momento, en la literatura sólo existe un modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos de acción de los periodontopatógenos en la aterosclerosis, el cual incluye condiciones de fluido, pero no tiene en cuenta la MEC con la cual el endotelio interacciona y se soporta tridimensionalmente(12). Por tanto, en la actualidad no existe un modelo *In vitro* de cultivo celular 3D para el estudio de los mecanismos efectores de los periodontopatógenos en la AT.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la respuesta pro-inflamatoria de Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *Porphyromonas gingivalis* W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la expresión de genes asociados a la función endotelial COX-2, eNOS y Factor von Willebrand (vWF) en HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional.
2. Comparar los niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), y quimiocinas (RANTES, MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e IL-8) producidas por HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional.
3. Comparar los niveles de tromboxano A2 y prostaglandina I2 producidos por HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1.1 Preparación de soportes de colágeno I:

Se utilizó colágeno tipo I a una concentración de 5 mg/ml, del cual se depositó 0,2 mg en placas de 24 pozos, inmediatamente se congeló durante 24 horas a -80°C para generar uniformidad en la distribución de las fibras, posteriormente se liofilizó durante 16 horas. Todas las placas con soportes de colágeno I fueron esterilizadas por irradiación UV por 15 minutos en cabina de cultivo celular previo a su uso. Este protocolo fue estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología-UIBO- durante el desarrollo de una tesis doctoral (Tesis Doctoral, Diego Gualtero)

### 4.1.2 Cultivo bacteriano

Para todos los ensayos se utilizó *P. gingivalis* W83 por considerarse una de las cepas más patogénicas a nivel oral y con mayor actividad virulenta sobre HCAEC (4). Su cultivo fue realizado de acuerdo a las técnicas estandarizadas en el laboratorio de microbiología oral del instituto UIBO de la Universidad El Bosque siguiendo las recomendaciones de Slots (56). En breve, se sembraron 30 µl del cepario crio- preservado en BHI con 10% glicerol en agar Brucella enriquecido con 0,3% de Bacto agar, 0,2% de extracto de levadura, 5% de sangre de cordero desfibrinada, 0,2% de sangre lacada, 0,0005% de hemina y 0,00005% de menadiona e incubada en atmósfera de anaerobiosis con 9-13% de CO<sub>2</sub> en concentraciones por debajo del 1% de oxígeno (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) a 36°C durante 7 días. La pureza del cultivo se confirmó mediante características microscópicas, además con la prueba de luz ultravioleta negativa y la prueba de CAAM positiva (NCBZ-GLY-GLY-ARG clorohidrato de 7-amido-4-metil coumarina, para la detección de enzimas tipo tripsina).

### 4.1.3 Cultivo y mantenimiento de células endoteliales de arteria coronaria humana(HCAEC):

Cultivos primarios de células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC, Lonza,USA) se sembraron en frascos T75 (Corning,USA) a una densidad de 5000 células /cm<sup>3</sup>e incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad) en medio EGM-2MV (LONZA, USA)

enriquecido con factores de crecimiento, el cual fue cambiado cada 2 días hasta observar una confluencia cercana al 80% de la superficie del plato. Los cultivos fueron tratados enzimáticamente y el sobrenadante centrifugado para realizar subcultivos y expandir la población. Las HCAEC fueron utilizadas en los diferentes experimentos entre los pases 6-9 del cultivo celular según las recomendaciones del fabricante (Lonza). HCAEC a una densidad de  $2 \times 10^5$  por pozo fueron sembradas en placas de 24 pozos directamente sobre la superficie plástica (cultivo bidimensional 2D) por 24 horas hasta la formación de una monocapa confluyente del 90% o sembradas directamente en la parte superior del soporte de colágeno y cultivadas por 7 días (cultivos tridimensional 3D) hasta alcanzar la confluencia en monocapa del 90%, tiempo de cultivo previamente estandarizado (tesis doctoral, Diego Gualtero, instituto UIBO, Universidad El Bosque); el medio de cultivo endotelial fue cambiado cada 48 horas luego de su siembra solo en el sistema de cultivo tridimensional.

#### 4.1.4 Preparación de inóculo de *P. gingivalis* W83 viva

Se partió de cultivos puros de *P. gingivalis* W83 de 4 días de incubación. Con un hisopo estéril se concentró la suspensión bacteriana en 10 ml de medio EGM-2MV (LONZA, USA) sin antibiótico, por lectura espectrofotométrica se ajustó a una densidad óptica entre 0.900-0.908 ( $\lambda=620$ ) (valores previamente estandarizados en el laboratorio de microbiología oral del instituto UIBO de la Universidad El Bosque). La suspensión preparada luego se dividió en dos alícuotas, una alícuota se usó para verificar el recuento del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL por el método de plaqueo partiendo de diluciones seriadas en base 10 y la otra alícuota se refrigeró en hielo e inmediatamente se utilizó para preparar y estimular las HCAEC a los MOI de estudio teniendo en cuenta el recuento bacteriano de la octava dilución seriada en base 10 (ver **Tabla 1**).

	<i>P. gingivalis</i> W83	
	UFC <sup>a</sup> ( $\times 10^8$ )	Log <sub>10</sub> UFC
<b>Replica 1</b>	4	8,60
<b>Replica 2</b>	3	8,48
<b>Replica 3</b>	3	8,48
<b>Promedio</b>	3,33	8,52
<b>Desviación estándar</b>		0,07

**Tabla 1.** Verificación del recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por el método de plaqueo. <sup>a</sup> Número de UFC en la dilución -8

#### 4.1.5 Infección de las HCAEC con *P. gingivalis* W83 viva o su control

Las HCAEC se infectaron a una Multiplicidad de Infección de 1 (MOI 1) y 100 (MOI 100) con 1 ml de inóculo cada una de *P. gingivalis* W83 viva por 24 horas tanto en los cultivos bidimensionales 2D como en los cultivos tridimensionales 3D en la misma placa en la cual se encontraban los dos tipos de cultivo. Los cultivos estimulados con LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a una concentración de 1 µg/ml por 24 horas se tomaron como control positivo de respuesta celular, a partir de la evidencia de ser un fuerte inductor de respuesta celular pro-inflamatoria en células HCAEC (Gualtero et al., 2017) (57). HCAEC sin infectar se tomaron como control sin estímulo para medir los valores basales de cada variable.

#### 4.1.6 Cuantificación de la expresión génica de eNOS, COX-2 y vWF en las HCAEC en los cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales.

La extracción de ARN de las HCAEC en las diferentes condiciones de estudio en los cultivos bidimensionales 2D se realizó por el método de fenol-cloroformo utilizando TRIzol® (Thermo, USA). Las HCAEC en los cultivos tridimensionales (3D), se sometieron a tratamientos con 1 ml de colagenasa a 1 mg/ml (Gibco, USA) durante 2 horas a 37°C para desprender las células de las matrices colágenas y posteriormente se extrajo el ARN por el método de fenol-cloroformo utilizando TRIzol® (Thermo, USA).

La cuantificación de la expresión de los genes relacionados con función endotelial eNOS, COX-2 y vWF se realizó por medio de la qRT-PCR con el kit qScript XLT 1-Step (Quanta, USA) con el siguiente método de amplificación: un ciclo a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 3 segundos y 60°C por 30 segundos; luego a 40°C por 1 min, y finalmente una curva melting desde 65°C hasta 95°C con incrementos de 0,5°C. En todos los análisis se colocaron 10 ng/µL de ARN. La expresión de cada gen fue normalizada por el nivel de expresión del gen constitutivo GAPDH dentro de cada tratamiento. La expresión relativa del gen de interés en cada tratamiento fue calculada respecto al control sin estímulo usando el método  $\Delta\Delta Cq$ , utilizando el software Bio-Rad CFX manager 3.1 (BIO-RAD, USA). Cada condición experimental fue analizada en tres experimentos independientes por duplicado. Las secuencias de los cebadores para los genes codificantes de eNOS, COX-2 y vWF son descritos a continuación:

eNOS (58)

Sentido: 5'-CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT-3'

Antisentido: 5'-GTCTCGGAGCCATACAGGATT-3'

COX-2 (59)

Sentido: 5'-AGGGTTGCTGGTGGTAGGAA-3'

Antisentido: 5'-GGTCAATGGAAGCCTGTGATACT-3'

vWF (60)

Sentido: 5'-CACCATTCAGCTAAGAGGAGG-3'

Antisentido: 5'-GCCCTGGCAGTAGTGGATA-3'

GAPDH (61) (Gen housekeeping):

Sentido: 5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3'

Antisentido: 5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3'

#### 4.1.7 Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ y quimiocinas RANTES, MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ e IL-8 producidos por las HCAEC en los cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales.

Los niveles de citocinas pro-inflamatorias: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  y quimiocinas RANTES, MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e IL-8 se midieron a partir de los sobrenadantes tanto de los cultivos celulares bidimensionales 2D como de los cultivos celulares tridimensionales 3D en las diferentes condiciones de estudio mediante citometría de flujo con el kit LEGENDplex™ (BioLegend, USA). Este sistema consiste en un inmunoensayo multiplex tipo sandwich que requiere el uso de perlas de captura para cada citocina en estudio. Cada población de perlas presenta diferentes tamaños y una intensidad interna de fluorescencia característica para un fluorocromo (APC), condiciones que permiten su diferenciación ya que cada población de perlas tiene una posición alfanumérica indicando su posición relativa respecto a otras poblaciones. Para determinar la concentración de cada citocina en la muestra, se utilizan anticuerpos de detección monoespecíficos para cada una de ellas; estos anticuerpos se encuentran biotinilados los cuales serán detectados por la adición de una solución de revelado que contiene ficoeritrina ligada a estreptavidina (SA-PE). A mayor cantidad de cada citocina capturada, mayor cantidad de señal generada por el complejo SA-PE. La adquisición de las muestras se llevaron a cabo usando un citómetro de flujo BD FACS Accuri™ C6 Plus.

Los resultados fueron generados con el software LEGENDplex, realizando los análisis sobre una curva estándar, generada en un modelo de regresión logística de 5 puntos; los niveles de citocinas obtenidos se expresaron en pg/mL. Los resultados mostrados son de 3 experimentos independiente por duplicado.

#### 4.1.8 Cuantificación de los niveles de Tromboxano A2 y Prostaglandina I2 producidos por las HCAEC en los cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales.

Se tomó el sobrenadante de cada una de las condiciones de estudio tanto en los cultivos bidimensionales 2D como en los cultivos tridimensionales 3D a partir de los cuales se realizó la medición Tromboxano A2 y Prostaglandina I2 mediante una ELISA de competencia, utilizando los kits Thromboxane B2 (cayman chemical, USA) y 6-keto Prostaglandin F1 $\alpha$  (cayman chemical, USA) respectivamente. La lectura espectrofotométrica de las placas se hizo en el Infinite 200 PRO (TECAN). Para el análisis de los datos se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se presentan los resultados de 1 réplica de tres experimentos independientes.

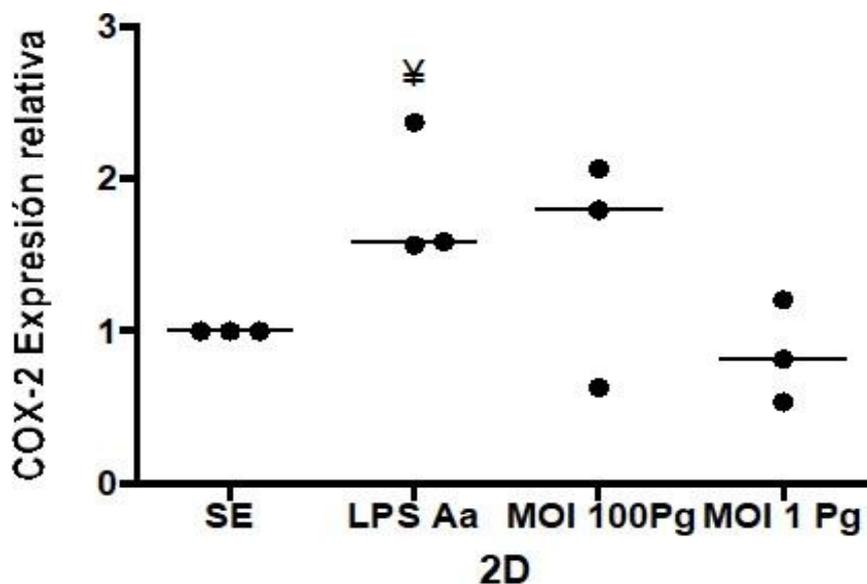
#### 4.1.9 Análisis de la Información

Para el análisis de datos comparativos de los genes y citocinas como marcadores de respuesta inflamatoria entre los tipos de cultivo celular bidimensional y tridimensional y las condiciones de estímulo, se utilizaron pruebas no paramétricas dado el tamaño muestral ( $n=3$ ) y por su distribución no normal posterior a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Se utilizó Kruskal- Wallis para la comparación entre todas las condiciones y U de Mann-Whitney por pares, considerándose las diferencias estadísticamente significativas cuando  $p<0.05$ .

## 5. RESULTADOS

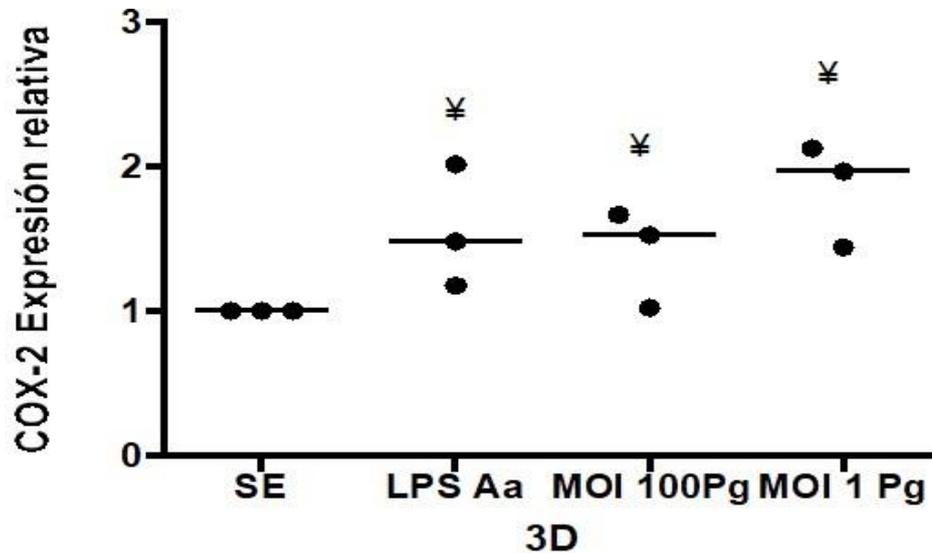
### 5.1 Expresión de genes asociados a la función COX-2, eNOS y factor von Willebrand (vWF) en HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 entre un modelo de cultivo celular tridimensional y uno bidimensional.

Los genes asociados a la función endotelial COX-2, eNOS y vWF juegan papeles importantes en la respuesta pro-inflamatoria o anti-inflamatoria de las células endoteliales, por tanto, su evaluación es importante para entender la respuesta inflamatoria de la célula endotelial. La **Figura 1** muestra la expresión relativa de COX-2 luego de 24 horas de infección de las HCAEC con *P. gingivalis* W83 en los cultivos bidimensionales 2D (HCAEC-2D). Al hacer la comparación entre los estímulos, no se observaron diferencias significativas en la expresión de COX-2 a MOI 100 y a MOI 1 de infección respecto al control sin estímulo (SE) ( $p=0.1667$ ).



**Figura 1.** Expresión relativa del gen COX-2 en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p<0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

En contraste, en los cultivos 3D a MOI 100 ( $p=0.0139$ ) y MOI 1 ( $p=0.0139$ ) la expresión de COX-2 fue significativamente mayor con relación al control sin estímulo (SE); nótese que la expresión del gen en el cultivo 3D es inversamente proporcional al MOI de infección. Ver **Figura 2**.



**Figura 2.** Expresión relativa del gen COX-2 en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1  $\mu\text{g/ml}$ ]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ≠  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

La **Figura 3** muestra la comparación de la expresión del gen en las diferentes condiciones de estudio entre los modelos de cultivos 2D y 3D. La expresión de COX-2 entre los modelos de cultivo mostró diferencias significativas solo para la infección a MOI 1, siendo mayor la expresión del gen en el modelo de cultivo tridimensional 3D ( $p= 0.0433$ ).

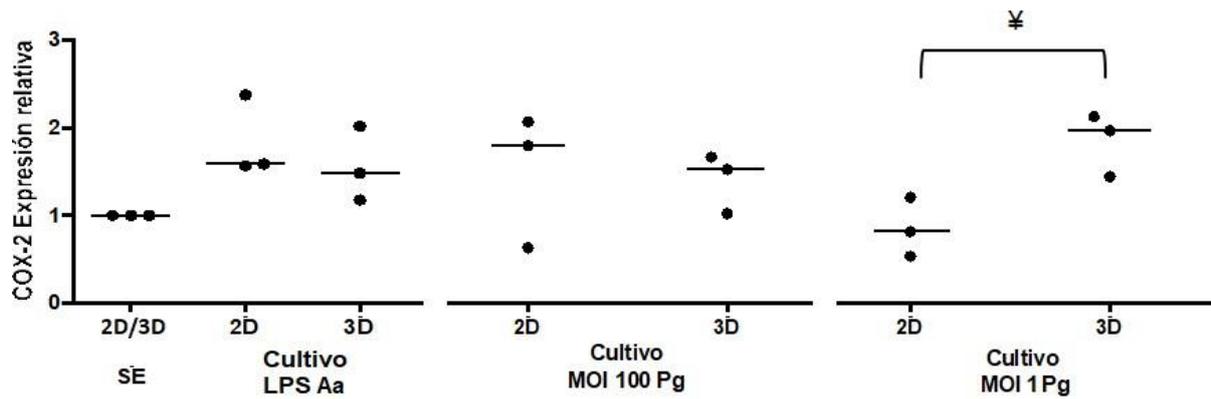


Figura 3. Comparación de expresión relativa del gen COX-2 en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ¥  $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Con relación a la expresión de eNOS en el modelo de cultivo 2D luego de 24 horas de infección, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen entre las infecciones a MOI 100 y MOI 1 respecto al control sin estímulo; sin embargo, en la infección a MOI 100 aumentó dicha expresión a un nivel que no alcanzó significancia estadística. Ver Figura 4

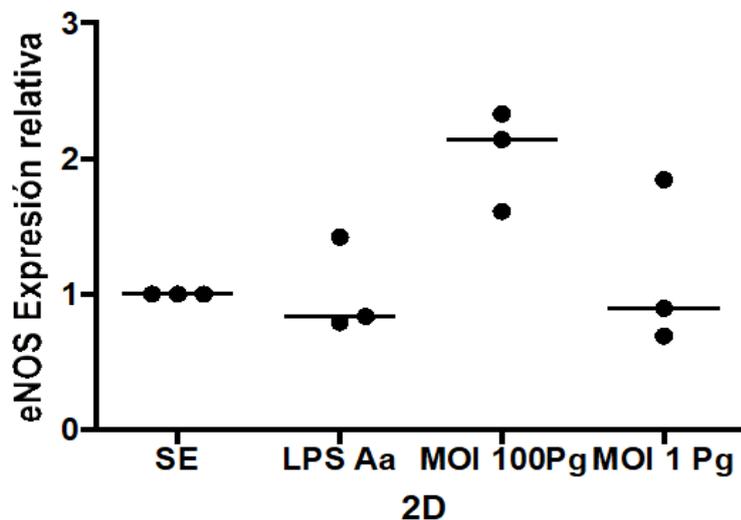
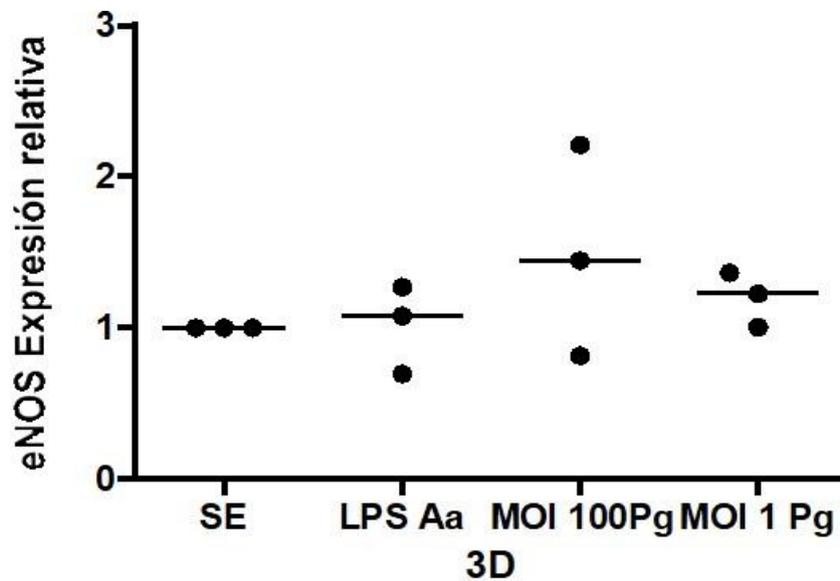


Figura 4. Expresión relativa del gen eNOS en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ¥  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

El patrón de expresión de eNOS en los cultivos 3D, mostró una condición muy parecida a la encontrada en los cultivos 2D. No se observaron diferencias significativas en la expresión de este gen. Ver **Figura 5**.



**Figura 5.** Expresión relativa del gen eNOS en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

La **Figura 6** muestra el comparativo de la expresión de eNOS entre los dos modelos de cultivo bidimensional y tridimensional y en las condiciones de estudio evaluados, en donde la expresión del gen fue similar entre ellos.

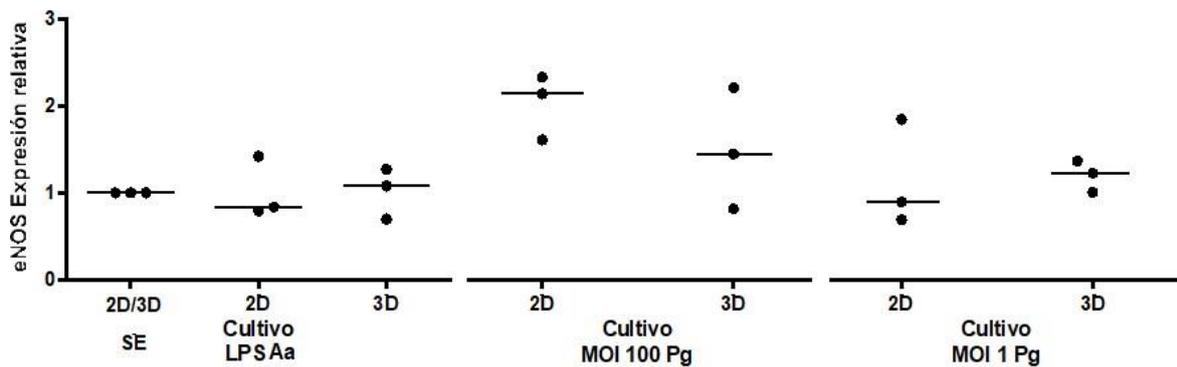


Figura 6. Comparación de expresión relativa del gen eNOS en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \* $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

De la misma manera, el perfil de expresión del vWF en los cultivos 2D pareció mantenerse en los niveles basales luego de 24 horas de infección con *P. gingivalis* W83. Ver **Figura 7**.

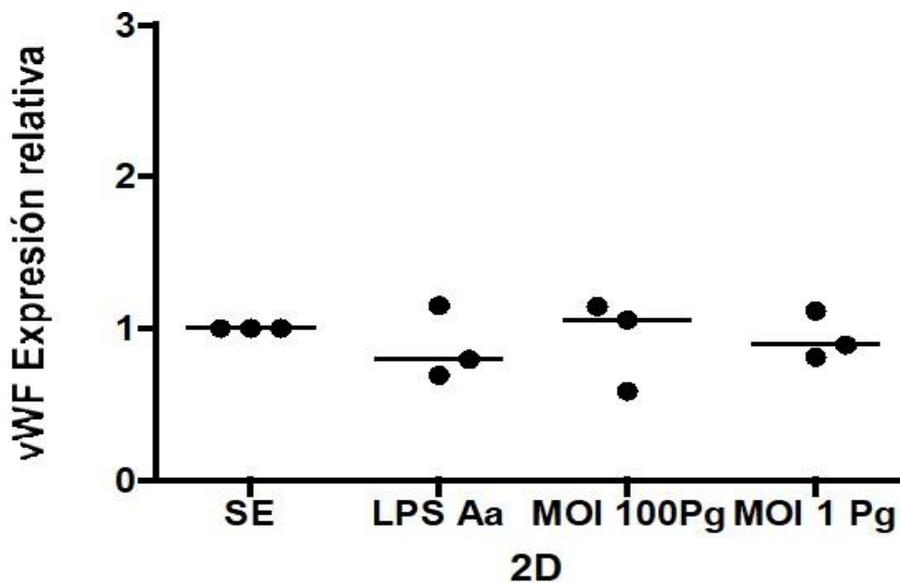
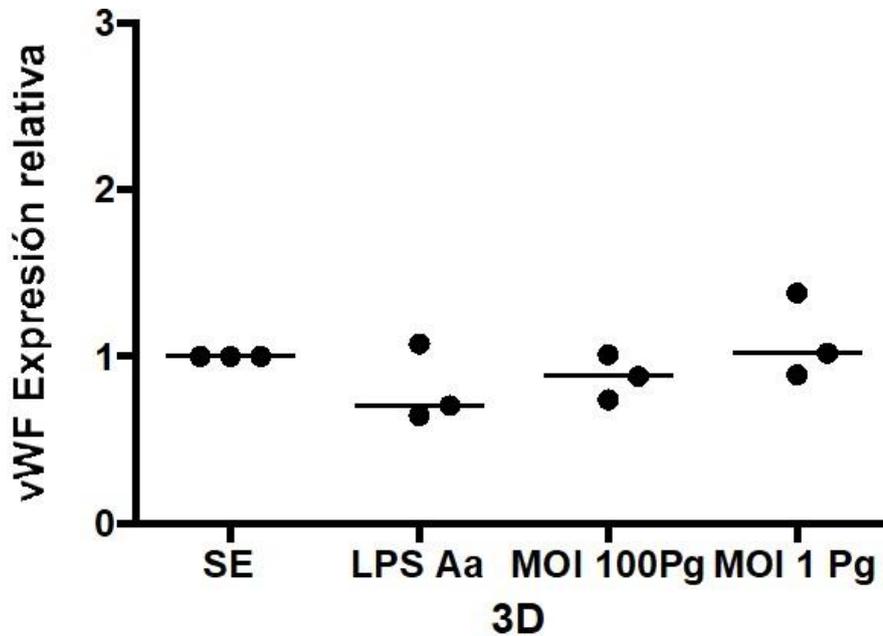


Figura 7. Expresión relativa del gen vWF en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \* $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

La **Figura 8** muestra el comportamiento de la expresión de vWF luego de 24 horas de infección con *P. gingivalis* W83 en el cultivo 3D. No se observan diferencias significativas en la expresión del gen.



**Figura 8.** Expresión relativa del gen vWF en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \* $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Al comparar la expresión de vWF entre los modelos de cultivo evaluados, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio y la respuesta es muy baja en todas las condiciones. Ver **Figura 9**.

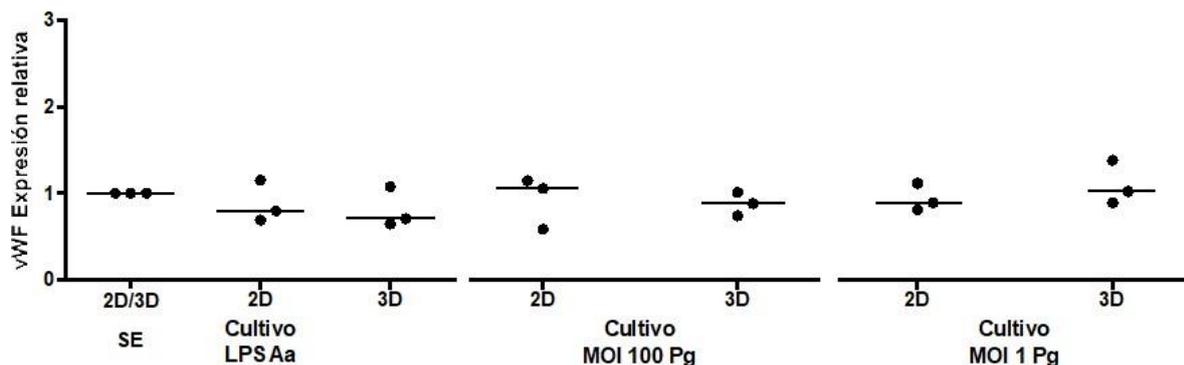


Figura 9. Comparación de expresión relativa del gen COX-2 en Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \* $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

## 5.2 Niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ), y quimiocinas (RANTES, MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ e IL 8) producidas por HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 en los modelos de cultivo celular de estudio.

El proceso de reclutamiento leucocitario, principalmente de monocitos al endotelio vascular y la activación tanto de estos leucocitos como de las células endoteliales, es un proceso llevado a cabo tanto por la quimiocinas como las citocinas pro-inflamatorias respectivamente, como reflejo de la disfunción endotelial. La cuantificación de mediadores inflamatorios solubles por citometría de flujo sólo mostró niveles detectables para IL-8, MCP-1 e IL-6. En la **Figura 10** se puede observar que los niveles de IL-8 en los cultivos 2D a MOI 100 de infección con *P. gingivalis* W83 mostró un aumento significativo ( $p=0.0039$ ) respecto al control sin estímulo. Los niveles de IL-8 a una infección de MOI 100 fueron mayores significativamente respecto a la infección a MOI 1 ( $p=0.0039$ ). No se observaron cambios significativos para la expresión de esta citocina cuando se infectó a MOI 1 respecto el control sin estímulo ( $p=0.0547$ ). El control positivo con LPS-A.a indujo un incremento significativo en la secreción de esta quimiocina como se esperaba.

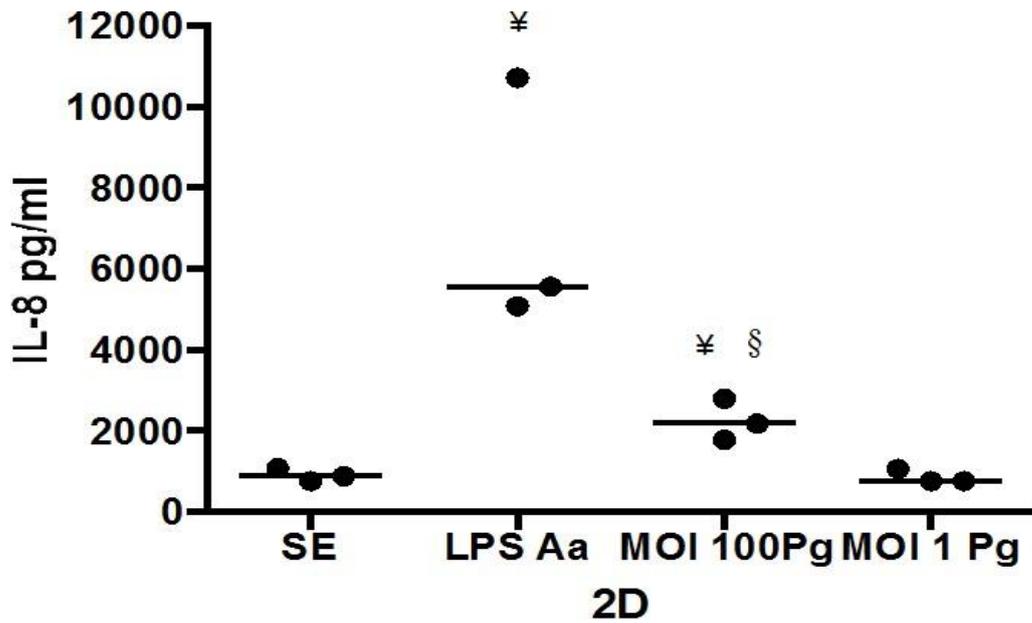


Figura 10. Niveles de IL-8 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D) medido por citometría de flujo. SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. 1:1. \*  $p < 0,05$  respecto a SE, §  $p < 0,05$  respecto a MOI 1. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

En la **Figura 11** se observan los niveles de IL-8 luego de 24 horas de infección en el cultivo 3D. A diferencia con los cultivos 2D, los niveles de esta citocina no mostraron variaciones significativas a MOI 100 ( $p=0.7488$ ) y MOI 1 ( $p=0.2002$ ) de infección respecto al control sin estímulo.

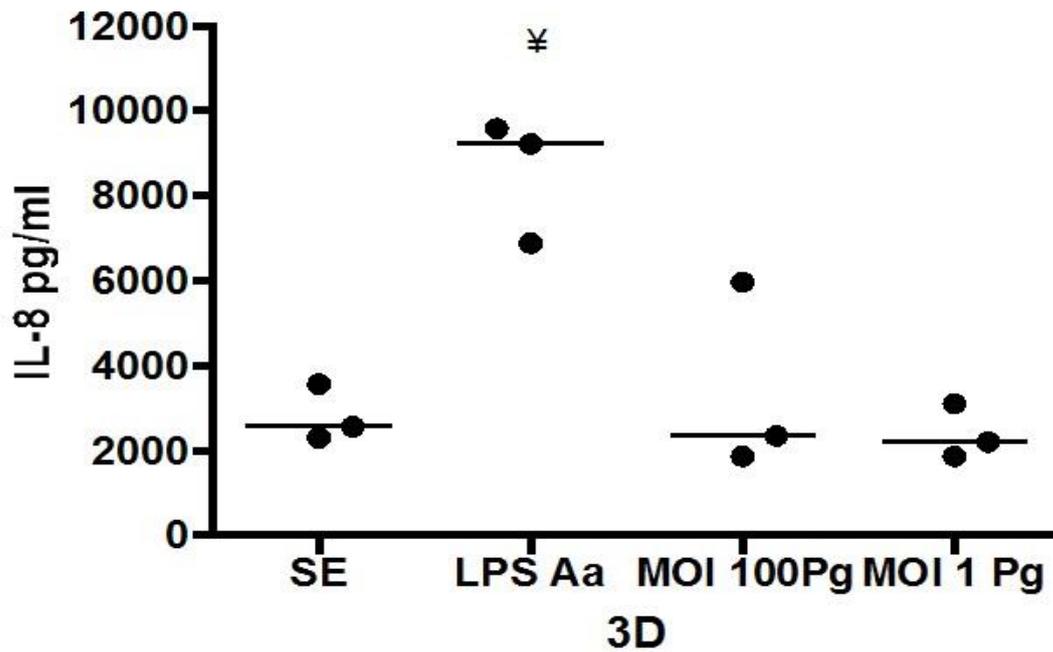


Figura 11. Niveles de IL-8 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D) medido por citometría de flujo. SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ≠  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

La comparación de los niveles de IL-8 en las diferentes condiciones de estudio entre los modelos de cultivos mostraron diferencias significativas en la infección a MOI 1 ( $p=0.0039$ ) al igual que en los controles sin estímulo ( $p=0.0039$ ), observando que la expresión de IL-8 fue mayor en los cultivos tridimensionales (3D). Ver **Figura 12**.

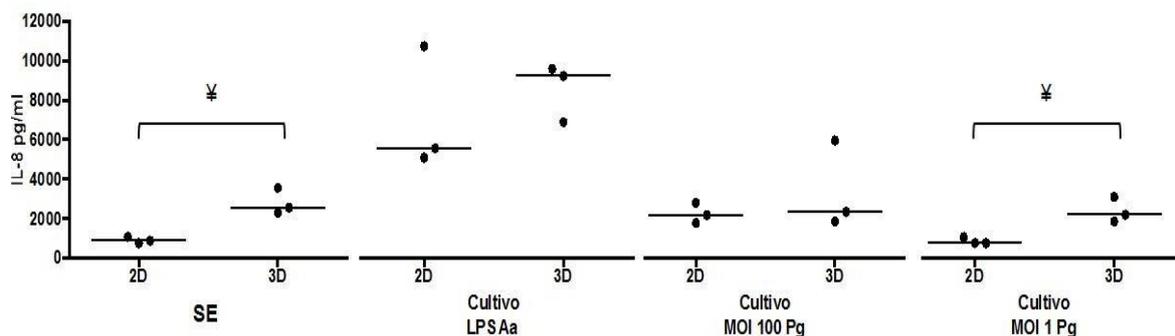
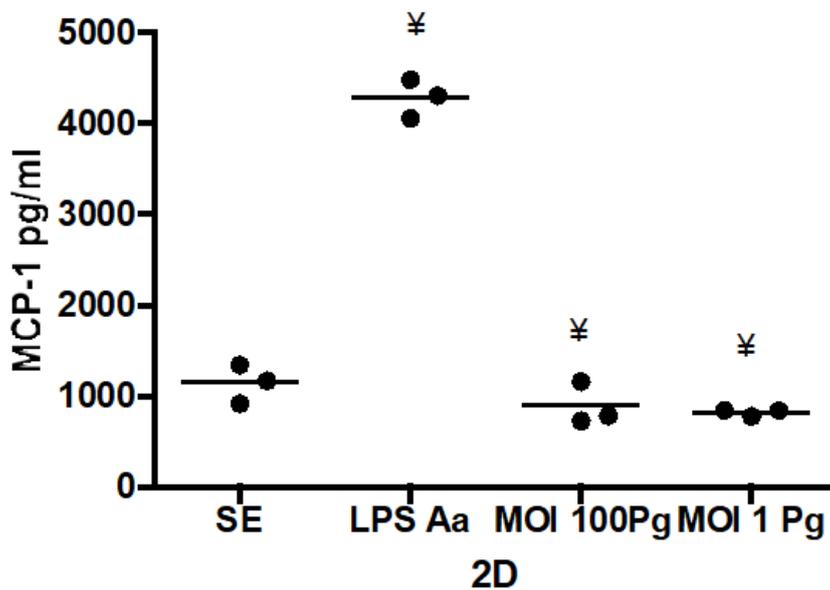


Figura 12. Comparación de los niveles de IL-8 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ≠  $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Por otra parte, la **Figura 13** muestra como los niveles de MCP-1 en los cultivos 2D son significativamente bajos respecto al control sin estímulo, luego de 24 horas de infección por *P. gingivalis* W83 tanto a MOI 100 ( $p=0.0374$ ) como a MOI 1 ( $p=0.0065$ ).



**Figura 13.** Niveles de MCP-1 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D) medido por citometría de flujo. SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ≠  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Sin embargo, el comportamiento de esta misma citocina en el modelo de cultivo tridimensional 3D mostró reducción únicamente en la infección a MOI 100 respecto a lo observado en la condición sin estímulo ( $p=0.0065$ ). Ver **Figura 14**.

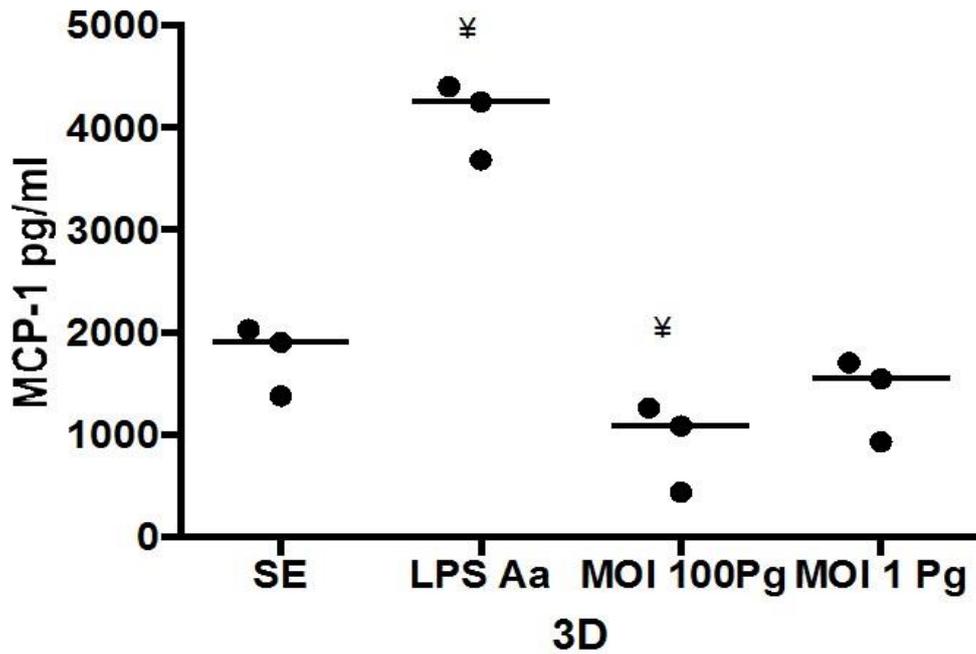


Figura 14. Niveles de MCP-1 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D) medido por citometría de flujo. SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ≠  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Al comparar entre los modelos de cultivo celular con cada condición de estudio, se observaron diferencias significativas en los niveles de MCP-1 en la infección a MOI 1 ( $p=0.0039$ ) y entre los controles sin estímulo ( $p=0.0163$ ), siendo mayor la respuesta en el modelo de cultivo tridimensional (3D). Ver **Figura 15**.

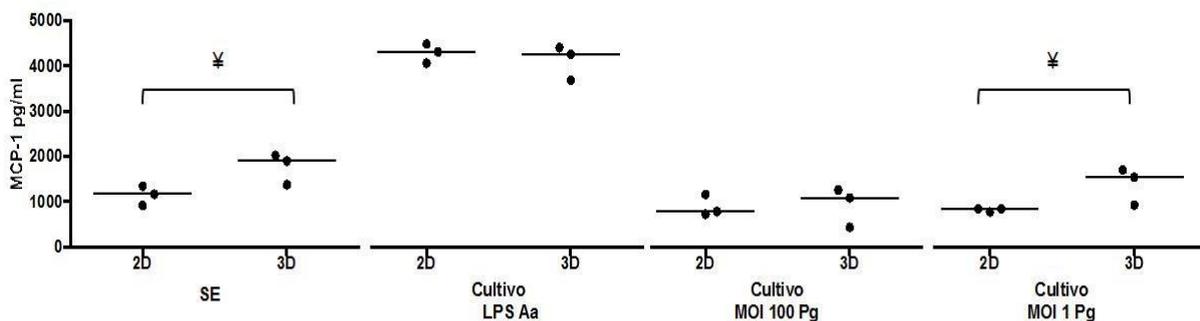
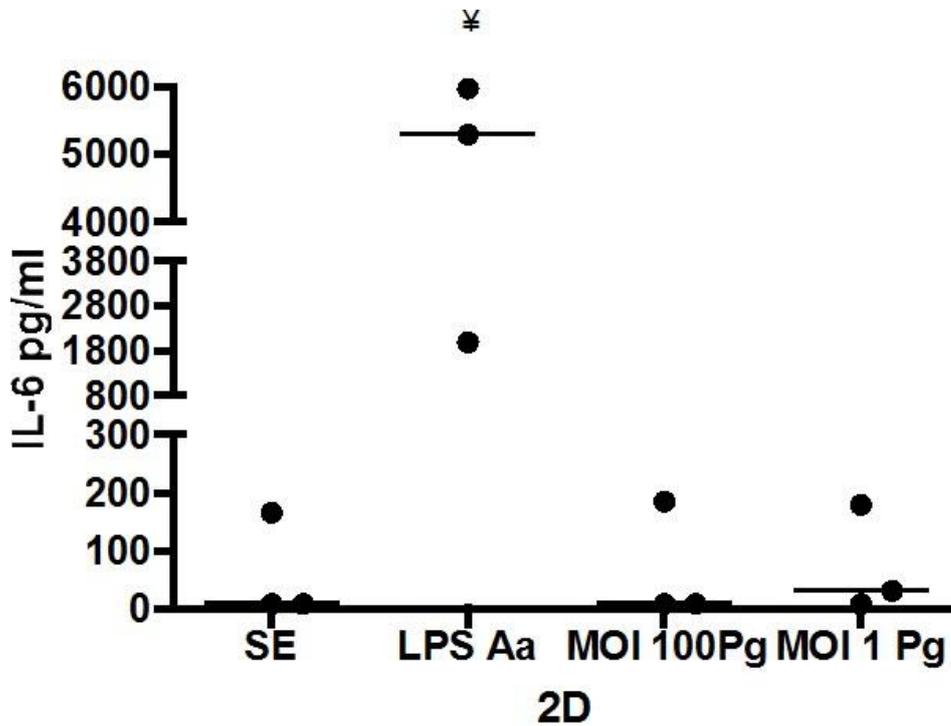


Figura 15. Comparación de los niveles de MCP-1 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. ≠  $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

La **Figura 16** muestra que la infección con *P. gingivalis* W83 en el modelo 2D indujo la producción de niveles bajos de IL-6, tanto en la infección a MOI 100 ( $p= 1.000$ ) como a MOI 1 ( $p= 0.7210$ ) sin mostrar variaciones estadísticamente significativas respecto al control SE. Por el contrario, y como se esperaba, hubo un incremento significativo de esta citocina comparado con el control sin estímulo en las células infectadas con LPS A.a.



**Figura 16.** Niveles de IL-6 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D) medido por citometría de flujo. SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1  $\mu\text{g/ml}$ ]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1.  $\neq p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Este mismo comportamiento se observó en los cultivos 3D, donde no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-6 luego de la infección con *P. gingivalis* W83 en los MOI evaluados. Ver **Figura 17**.

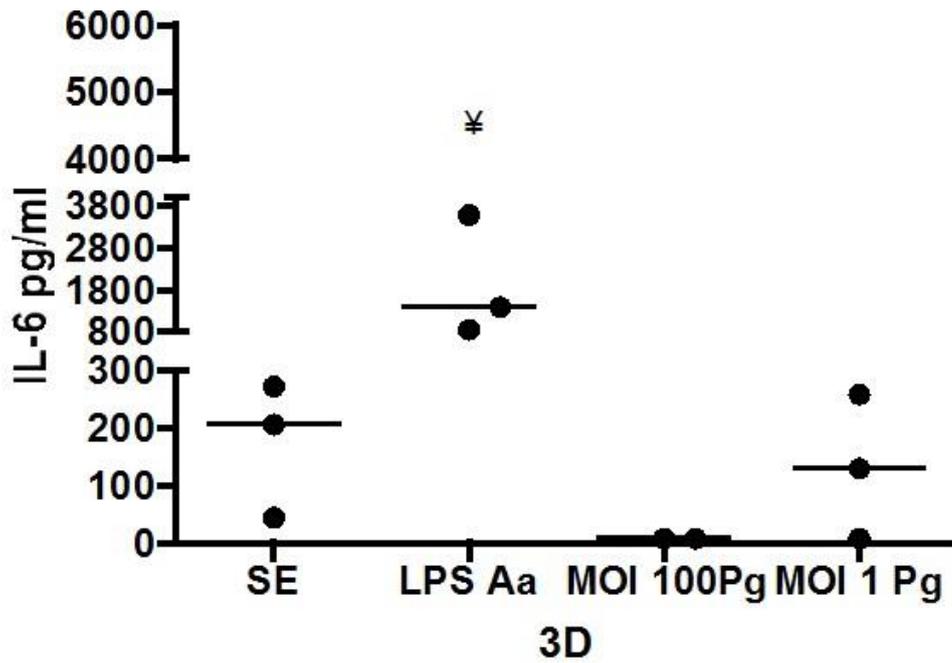


Figura 17. Niveles de IL-6 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D) medido por citometría de flujo. SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \* $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

La comparación de IL-6 en las diferentes condiciones en los dos modelos de cultivo evaluados, no muestran diferencias significativas, Ver **Figura 18**.

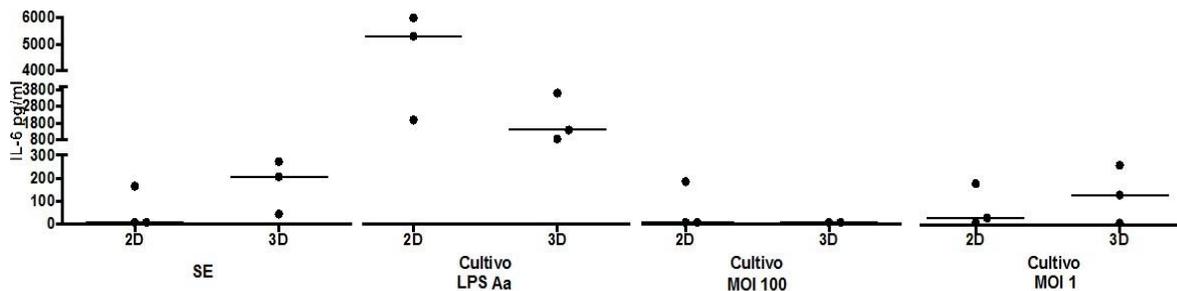


Figura 18. Comparación de los niveles de IL-6 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, LPS Aa: lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 [1 µg/ml]. MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \* $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

### 5.3 Niveles de tromboxano A2 y prostaglandina I2 producidos por HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 en los modelos de cultivos celular de estudio.

Los prostanoides producto del metabolismo del ácido araquidónico están involucrados en la la disfunción endotelial y la AT, la prostaglandina I2 (PGI2) como un factor ateroprotector por su acción anti-inflamatoria y el tromboxano A2 como un factor de progresión de la enfermedad por ser pro-inflamatorio. En la **Figura 19** se muestra que las variaciones en los niveles de PI2 a MOI 100 y MOI 1 de infección, no fueron estadísticamente diferentes respecto al control sin estímulo.

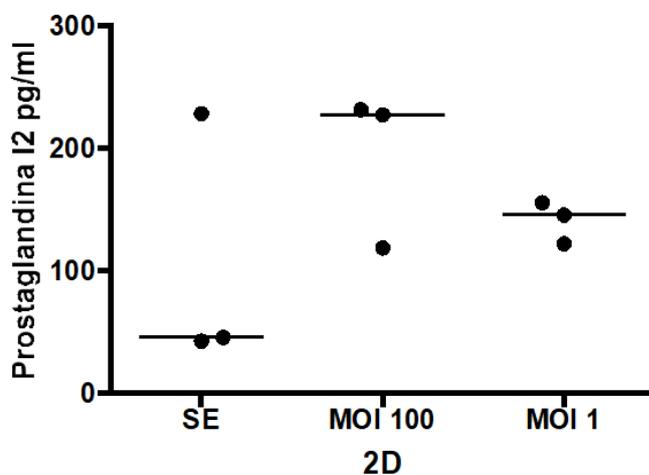


Figura 19. Niveles de PGI2 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D) medido por ELISA. SE: control sin estímulo, MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Por otra parte, en los cultivos 3D los niveles de PGI2 variaron levemente a MOI 100 y MOI 1 de infección respecto al control sin estímulo, sin ser estadísticamente significantes. Ver **Figura 20**

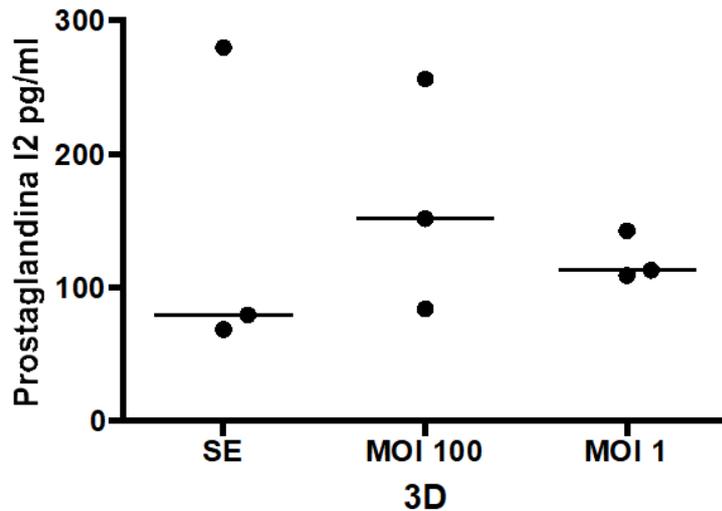


Figura 20. Niveles de PGI<sub>2</sub> producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D) medido por ELISA. SE: control sin estímulo, MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Interesantemente, los niveles de PGI<sub>2</sub> en las infecciones a MOI 100 y MOI 1 fueron mayores en los cultivos 2D que en los cultivos 3D, al contrario a lo mostrado en las condiciones sin estímulo, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Ver **Figura 21**.

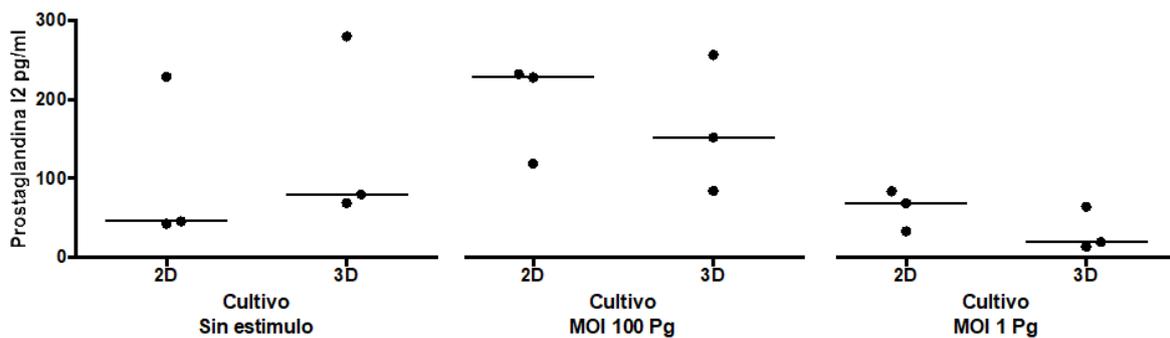
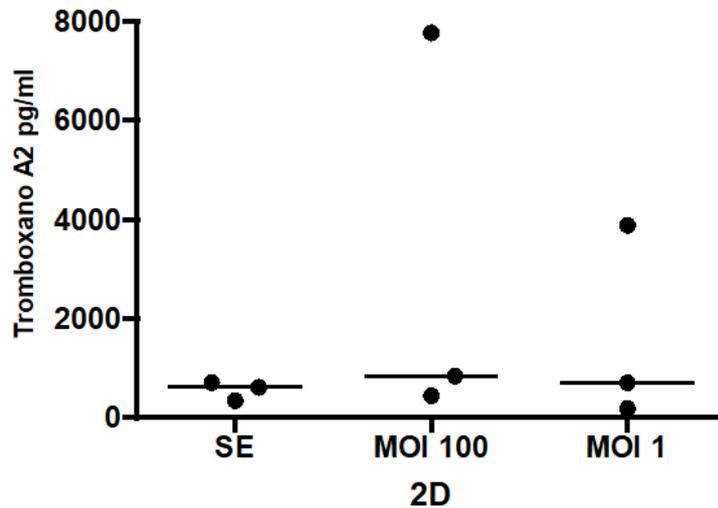


Figura 21. Comparación de los niveles de PGI<sub>2</sub> producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Por otro lado, la **Figura 22** muestra que las diferencias en los niveles de tromboxano A2 en los cultivos 2D a MOI 100 y MOI 1 de infección respecto a sin estímulo, no fueron significativas estadísticamente.



**Figura 22.** Niveles de TXA2 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares bidimensionales (2D) medido por ELISA. SE: control sin estímulo, MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Así mismo, los niveles de TXA2 en los cultivos 3D muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas en las infecciones a MOI 100 y MOI 1 respecto a control SE como lo muestra la **Figura 23**.

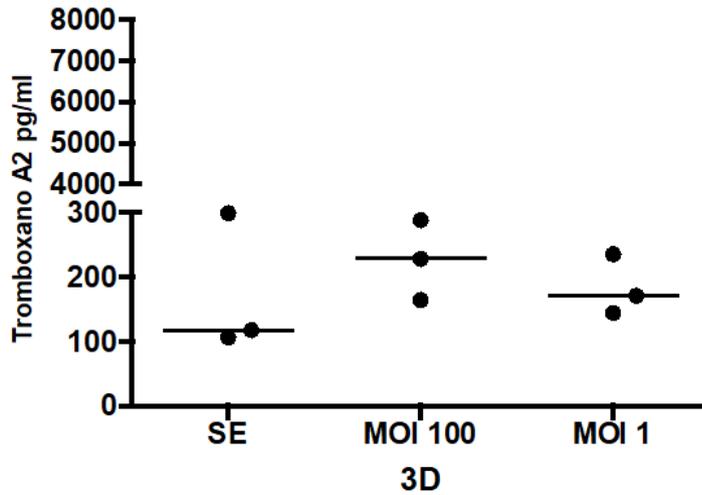


Figura 23. Niveles de TXA2 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección en los cultivos celulares tridimensionales (3D) medido por ELISA. SE: control sin estímulo, MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  respecto a SE. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

Como se aprecia en la **Figura 24** los niveles de TXA2 fueron mayores en el modelo 2D respecto al modelos 3D tanto en el control sin estímulo ( $p=0.0495$ ) como en la infección a MOI 100 ( $p=0.0495$ ).

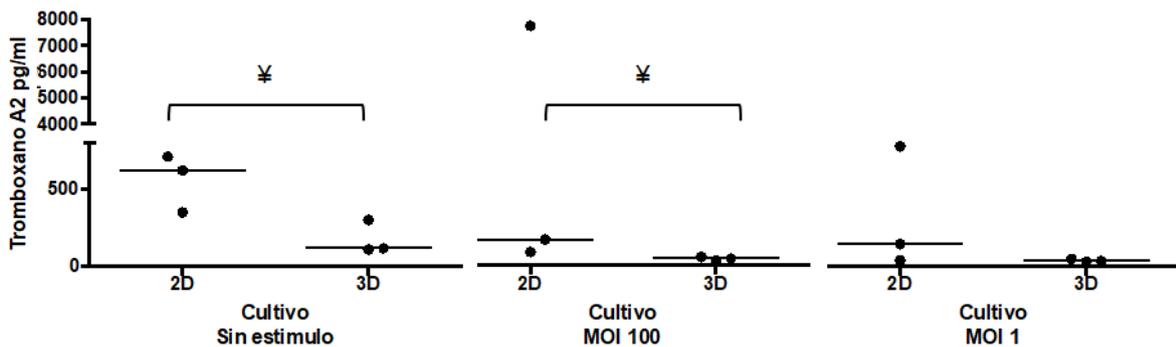


Figura 24. Comparación de los niveles de TXA2 producidos por Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) frente a *P. gingivalis* W83 a 24 horas post-infección entre los cultivos bidimensionales (2D) y los cultivos tridimensionales (3D). SE: control sin estímulo, MOI 100: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 100:1. MOI 1: multiplicidad de infección *P. gingivalis*/HCAEC 1:1. \*  $p < 0,05$  entre modelo 2D y 3D. Los datos son representados por la mediana de cada grupo de tres experimentos independientes por duplicado.

## 6. DISCUSIÓN

Los estudios *in vitro* poco a poco se están direccionando hacia la utilización de modelos de cultivo celular 3D que implementan componentes de matriz extracelular (MEC) para proporcionar características propias del microambiente tisular como la interacción y soporte tridimensional que esta provee, los cultivos convencionales desarrollados sobre superficies planas de plástico o de vidrio (cultivo celular 2D) no simulan ni proporcionan las condiciones ideales de estudio para la comprensión del comportamiento celular, además se ha puesto de manifiesto diferencias en las respuestas celulares en diferentes contextos de investigación entre los modelos de cultivo celular 3D y 2D (1, 46, 47). Debido a esto, y teniendo en cuenta que los estudios *in vitro* para el estudio de los mecanismos por medio de los cuales los periodontopatógenos inducen procesos de disfunción endotelial se han hecho principalmente en modelos de cultivos 2D (12); el objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta inflamatoria de células endoteliales frente a *P. gingivalis* entre un modelo de cultivo celular convencional 2D y un modelo de cultivo celular 3D con soportes de colágeno.

*P. gingivalis* es un periodontopatógeno que tiene capacidad de evadir la respuesta inmune y como ha sido aislado viable de placas ateroscleróticas humanas, se ha asociado con la aterosclerosis (8, 62). La respuesta inflamatoria inducida en las células endoteliales por diferentes microorganismos o factores derivados de ellos, conducen a la activación del endotelio que es una de las características de la disfunción endotelial, evento tempranamente asociado a los procesos aterogénicos (63). Una de las principales características de *P. gingivalis* es la inducción de respuestas celulares proinflamatorias variables en diferentes tipos celulares como monocitos, macrófagos, y células endoteliales (CEs) (3, 64), por lo cual estudiar los mecanismos por medio de los cuales este microorganismo induce respuesta inflamatoria en células endoteliales y su posible implicación en los procesos de disfunción endotelial, es importante.

La respuesta de las HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 en los cultivos 2D mostró un aumento de los niveles IL-8 a MOI 100 y un descenso de los niveles de MCP-1 tanto a MOI 100 como a MOI 1 de infección respecto a los controles sin estímulo. En el modelo cultivo celular 3D la respuesta de las HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 se caracterizó por un aumento en la expresión de COX-2 tanto a MOI 100 como a MOI 1 y una reducción de los niveles de MCP-1 a MOI 100 de infección respecto a los controles sin estímulo. A pesar de lo anterior y en general, la respuesta pro-inflamatoria observada entre el modelo de cultivo celular 2D y el modelo de cultivo celular 3D no mostró diferencias significativas entre los modelos. Estos resultados serán objeto de análisis y discusión a continuación.

En respuesta a los diferentes estímulos a los que son sometidas las células endoteliales se activan o inhiben la transcripción de genes asociados a la función endotelial como los de COX-2, eNOS y vWF, los cuales están involucrados, entre otras funciones, en la respuesta inflamatoria endotelial de una manera pro o anti-inflamatoria. COX-2 es una enzima cuya acción interviene en la biosíntesis de prostanoïdes como el tromboxano A2 y prostaglandina I2, lo cual la involucra en los procesos inflamatorios celulares (65). Similar a lo reportado previamente por Chou et al (66) utilizando *P. gingivalis* 381, en el presente trabajo, *P. gingivalis* W83 indujo aumento (no significativo) en la expresión génica de COX-2 en las HCAEC en el cultivo 2D (HCAEC-2D) a MOI 100 (**Figura 1**), a pesar de las diferencias en las cepas utilizadas entre estos dos estudios. Sorpresivamente el mayor aumento en la expresión de COX-2 en las HCAEC en el cultivo 3D (HCAEC-3D) fue en la infección a MOI 1 (**Figura 2**), que también fue significativamente mayor en la comparación entre los modelos de cultivo (**Figura 3**), sugiriendo un papel del colágeno en la expresión de COX-2 en las HCAEC en respuesta a *P. gingivalis* W83, tema que será objetivo de estudio en futuras investigaciones.

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) ha mostrado ser un factor ateroprotector (24) con acción anti-inflamatoria debido a la síntesis de óxido nítrico. La expresión génica de eNOS en las HCAEC-2D aumentó (sin ser significativo) a MOI 100 (**Figura 4**). En otros modelos la infección de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por siglas en inglés) con *P. gingivalis* W83 (67) y con *P. gingivalis* ATCC 33277 (68) redujeron los niveles solubles de eNOS mediado por la inducción de la activación del PPAR $\gamma$  en las CE (67) y la acción de la HSP 60 bacteriana (69), sin embargo, en el modelo de éste trabajo, no se puede relacionar estos datos adecuadamente ya que no se midió la concentración soluble de eNOS.

El llamado quimiotáctico y la adhesión de leucocitos al endotelio vascular es una consecuencia de la activación endotelial, característico de la disfunción endotelial (34). La IL-8 es el principal quimioattractante de neutrófilos, sin embargo, en el contexto de la aterosclerosis ayuda al rodamiento de los monocitos promoviendo una adherencia firme al endotelio a través de la E-selectina (70). En este trabajo, los niveles de IL-8 se aumentaron significativamente en las HCAEC-2D luego de la infección con MOI 100 respecto al control sin estímulo (**Figura 10**). Previamente se ha reportado *in vitro* en un modelo 2D la capacidad de diferentes cepas de *P. gingivalis* como A7436, 33277 y 381 de inducir la producción de IL-8 en HUVEC de una forma fimbria-dependiente (14), sin embargo, *P. gingivalis* W83 no expresa fimA (4), por lo cual los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) por medio de los cuales está induciendo la producción de IL-8 en el

modelo 2D, son diferentes a las fimbrias. *P. gingivalis* tiene la capacidad *in vitro* de proteolizar IL-8 producida por HUVEC por medio de sus gingipaínas (14, 52), sin embargo, dado que los niveles de IL-8 no se redujeron respecto al control sin estímulo en ninguno de los modelos evaluados, no pueden ser atribuidas a este factor (**Figuras 10 y 11**).

La proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) es un importante quimioattractante de monocitos involucrado en el proceso aterogénico (71). Los niveles de MCP-1 en los dos modelos de cultivo celular se redujeron en las infecciones tanto a MOI 100 como a MOI 1 (**Figuras 13 y 14**), lo cual puede ser probable debido a la acción proteolítica de las gingipaínas de *P. gingivalis* W83 sobre la MCP-1, como ha sido reportado previamente con la cepa 381 sobre HUVEC (52); sin embargo, estos datos son contrarios a lo reportado por Rodríguez et al (4) con *P. gingivalis* W83, en donde evidenciaron aumento de los niveles de MCP-1 en una infección a MOI 100 en HAEC. Probablemente las discrepancias sean por el tipo de CEs utilizadas en los diferentes estudios.

La IL-6 juega un papel importante en la formación de estría grasa, incrementando la proliferación y migración de células de músculo liso, así como la inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda, eventos relacionados con el proceso aterogénico (53). La infección con *P. gingivalis* W83 no indujo el aumento de IL-6 en los modelos 2D y 3D de éste estudio (**Figuras 16 y 17**), hallazgo concordante con lo reportado por Rodríguez et al en un modelo bidimensional 2D en HAEC (4).

El TXA2 como mediador de la progresión de la aterosclerosis y PGI2 como ateroprotector ha sido reportado previamente en modelos *in vivo* (26). En HCAEC estimuladas con histamina y LPS de *E. coli* se ha evidenciado aumentos de PGI2 por acción de COX-2 y se plantea como una respuesta de mantenimiento de la integridad vascular (58). Los aumentos respecto a sin estímulo de los niveles tanto de TXA2 como PGI2 en los modelos de estudio no fueron significativos (**Figuras 19, 20, 22 y 23**), a pesar de esto, los niveles de TXA2 fueron mayores en el modelo de cultivo 2D en la infección a MOI 100 respecto al modelo de cultivo 3D (**Figura 24**). Sin embargo, es difícil interpretar si este aumento de COX-2 corresponde a una respuesta proinflamatoria vía tromboxano A2 (TXA2) o una respuesta anti-inflamatoria vía prostaglandina (PGI2) debido a que no realizamos ensayos de inhibición de COX-2 en las HCAEC y los resultados tanto de TXA2 como de PGI2 no son concluyentes; por tanto, la evaluación del papel de COX-2 en la respuesta proinflamatoria o anti-inflamatoria en un modelo de cultivo celular tridimensional 3D frente a *P. gingivalis* W83 se convierte en un tema de mucho interés para futuros trabajos.

*P. gingivalis* W83 se caracteriza *in vitro* por su alta capacidad de adherirse, invadir y persistir en las HAEC (4), propiedades que han sido asociadas a la inducción de disfunción endotelial (5), por tanto, es una excelente cepa candidata para estudiar los mecanismos por medio de los cuales este periodontopatógeno está asociado en los procesos aterogénicos.

Contrario a lo que se esperaría, se ha descrito que *P. gingivalis* W83 es una débil inductora de respuesta inflamatoria en CEs comparada con la respuesta observada con otras cepas como ATCC 33277 y 381 (4), capacidad atribuida a la presencia de cápsula con antígeno capsular K1 en W83, la cual reduce la inducción de la respuesta inflamatoria en otros tipos de células como fibroblastos gingivales humanos (72) y macrófagos (73), explicándose como un mecanismo de evasión del sistema inmune y el aumento de su virulencia. El hecho de haber utilizado en este trabajo una cepa capsulada de *P. gingivalis* puede explicar por qué las infecciones tanto a MOI 100 como a MOI 1 tanto en el modelo 2D como en el modelo 3D no indujeron aumentos significativos (a excepción de IL-8 a MOI 100 en las HCAEC-2D) de IL-8 e IL-6 respecto a los controles sin estímulo, y probablemente la poca respuesta inflamatoria en los dos modelos de cultivo celular.

Un resultado interesante son los niveles de IL-8 y MCP-1 a MOI 1 que aparentemente son mayores en el modelo 3D respecto al modelo 2D (**Figuras 12 y 15**), lo que podría llevar a pensar que las principales diferencias en la respuesta inflamatoria de HCAEC frente *P. gingivalis* W83 entre los modelos de cultivo se encuentran en esta condición de infección, sin embargo, esto no es así, ya que los niveles de esas dos quimiocinas a MOI 1 son casi iguales a los encontrados en los controles sin estímulo, por tanto esas diferencias no corresponden a una respuesta a *P. gingivalis* W83 sino a los niveles basales de esas dos quimiocinas producidos por las HCAEC en los modelos de estudio, probablemente debido a la interacción de las HCAEC con la MEC de colágeno tipo I. La única diferencia encontrada en respuesta a *P. gingivalis* W83 entre los modelos de estudio fue la expresión de COX-2 comparada con el control. (**Figura 3**).

Con los resultados de este trabajo, no se puede mantener la hipótesis que la respuesta inflamatoria de HCAEC en el modelo de cultivo celular 3D es menor que en el modelo de cultivo celular 2D frente a *P. gingivalis* W83 inicialmente planteada, debido a que en general no se encontraron diferencias en la respuesta pro-inflamatoria de las HCAEC frente a *P. gingivalis* W83 entre los dos modelos de cultivo celular estudiados. Sin embargo, éste se convierte en el primer estudio en evaluar la respuesta inflamatoria de HCAEC en un modelo de cultivo celular 3D frente a un periodontopatógeno como *P. gingivalis*. Para futuras investigaciones en el área, se recomienda utilizar una cepa no capsulada con alta capacidad

de inducir una respuesta inflamatoria en HCAEC como *P. gingivalis* 381(4) y la evaluación de la infección en el tiempo, para de esta forma poder evaluar más claramente las diferencias en la respuesta inflamatoria entre modelos de cultivos celular 3D y 2D. Por tanto, más investigación en la evaluación de la respuesta inflamatoria de HCAEC en modelos de cultivos celulares 3D frente a *P. gingivalis* es necesaria.

Este trabajo al ser el primero en evaluar la respuesta inflamatoria de células endoteliales a un periodontopatógeno como *Porphyromonas gingivalis* en un modelo de cultivo 3D presenta diferentes limitaciones en el modelo de estudio planteado. En la **Tabla 2** se resumen las ventajas, desventajas y recomendaciones en aspectos como la cepa de *Porphyromonas gingivalis*, el tipo de células endoteliales, el tiempo de cultivo, controles, resultados, tiempo de infección y citocinas evaluadas que permiten tener en cuenta por una parte las limitaciones del trabajo y por otra aportar al mejoramiento del modelo de estudio de la respuesta inflamatoria de células endoteliales a diferentes periodontopatógenos.

Aspecto	VENTAJAS	DESVENTAJAS	RECOMENDACIÓN
<b>Cepa de <i>P. gingivalis</i> W83</b>	Altamente virulenta en células endoteliales de arteria humana	Dificulta evaluar la respuesta inflamatoria endotelial por ser una cepa capsulada	Utilizar una cepa no capsulada con alta capacidad de inducir respuesta inflamatoria en células endoteliales como la <i>P. gingivalis</i> 381.
<b>Células endoteliales (cultivo primario): HCAEC</b>	Permiten una buena aproximación el contexto fisiológico	Envejecimiento celular en sub-cultivo	Seguir utilizando HCAEC
<b>Tiempo de cultivo</b>	Permitieron que en los dos modelos de cultivo se alcanzara 100% de confluencia (cultivo 2D 24 horas, cultivo 3D 7 días)	No hay comparabilidad de los tiempos en cultivo (cultivo 2D 24 horas, cultivo 3D 7 días)	Estandarizar un cultivo celular 3D que alcance confluencia manteniendo su fenotipo en 24 horas
<b>Control de estimulación celular: LPS Aa</b>	Control de estimulación celular adecuado para evaluar citocinas y quimiocinas producidas por células endoteliales	No es un control adecuado para evaluar la expresión de genes asociados a la función endoteliales.	Utilizar histamina como control de estimulación para la evaluación de expresión de genes asociados a la función endoteliales.
<b>Resultados</b>	Aproximación al entendimiento de la respuesta inflamatoria endotelial frente a <i>P. gingivalis</i> en cultivo 3D	Variabilidad de los datos	Aumentar el tamaño de muestra
<b>Tiempo de infección: 24 horas</b>	Tiempo estándar en modelos de infección in vitro	No permite evaluar la respuesta inflamatoria endotelial frente a <i>P. gingivalis</i> a través del tiempo	Evaluar más tiempos de infección, por lo menos un tiempo antes y un tiempo después del aplicado en este trabajo
<b>Citocinas evaluadas</b>	Se evaluaron citocinas pro-inflamatorias clásicas en la respuesta endotelial a Pg	No se evaluaron citocinas anti-inflamatorias, lo cual limita la evaluación integral de la respuesta inflamatoria endotelial a Pg	Medir simultáneamente citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$

**Tabla 2.** Ventajas, desventajas y recomendaciones del modelo de cultivo celular evaluado.

## 7. CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados de este proyecto permiten concluir que a pesar que en el modelo de cultivo celular 3D las HCAEC en respuesta a *P. gingivalis* W83 a una infección de MOI 1 aumentan la expresión de COX-2 respecto el modelo convencional de cultivo celular 2D, en general no hay diferencias en la respuesta inflamatoria endotelial entre los modelos de cultivo celular, sin embargo, este comportamiento en la respuesta celular probablemente estuvo influenciado por la cepa capsulada de *P. gingivalis* utilizada en este trabajo y no por los modelos de cultivo celular en sí mismos. Por tanto, no se descarta la utilización del modelo de cultivo celular 3D para evaluar la respuesta pro-inflamatoria endotelial frente a otros microorganismos periodontopatógenos, incluyendo otras cepas de *P. gingivalis*.

## 8. REFERENCIAS

1. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014; 12:207-18.
2. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol.* 2015; 230:16-26
3. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15:30-44.
4. Rodríguez PH et al. Porphyromonas gingivalis strain specific interactions with human coronary artery endothelial cells: a comparative study. *PLoS One.* 2012; 7:e52606.5.
5. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!"-- epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res.* 2010; 89:879-902.
6. Velsko IM et al. Active invasion of oral and aortic tissues by Porphyromonas gingivalis in mice causally links periodontitis and atherosclerosis. *PLoS One.* 2014; 16:9:e97811.
7. Castillo DM et al. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol.* 2011; 38:418-27.
8. Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA,Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:e17-8.
9. Maekawa T et al. Chronic oral infection with Porphyromonas gingivalis accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One.* 2011; 6:e20240.
10. Galkina E & Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:165-97.
11. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15 (8):1983-92.
12. Gualtero DF, Lafaurie GI, Fontanilla MR. Two-dimensional and three-dimensional models for studying atherosclerosis pathogenesis induced by periodontopathogenic microorganisms. *Mol Oral Microbiol.* 2018 Feb;33(1):29-37.

13. Nakamura N et al. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis*. 2008; 196:59-67.
14. Nassar H, Chou HH, Khlgatian M, Gibson FC III, Van Dyke TE, et al. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun*. 2002; 70: 268–276.
15. Champaiboon C et al. Differential inflammasome activation by *Porphyromonas gingivalis* and cholesterol crystals in human macrophages and coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;235:38-44.
16. Dela Paz NG, D'Amore PA. Arterial versus venous endothelial cells. *Cell and tissue research*. 2009;335(1):5-16.
17. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005;97(11):1093-107.
18. Anderson DE, Hinds MT. Extracellular matrix production and regulation in micropatterned endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(1):159-64.
19. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(12):1508-12.
20. Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz*. 2007;32(7):568-72.
21. Tanaka Y, Yamaki F, Koike K, Toro L. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI<sub>2</sub> analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004;2(3):257-65.
22. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S423-8.
23. Stitham J, Midgett C, Martin KA, Hwa J. Prostacyclin: An Inflammatory Paradox. *Frontiers in Pharmacology*. 2011;2:24.
24. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):998-1005.
25. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice.

26. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, et al. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004;114(6):784-94.
27. Gabrielsen A, Qiu H, Bäck M, Hamberg M, Hemdahl AL, Agardh H, Folkersen L, et al. Thromboxane synthase expression and thromboxane A2 production in the atherosclerotic lesion. *J Mol Med (Berl).* 2010;88(8):795-806.
28. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase products and atherosclerosis. *Drug discovery today Therapeutic strategies.* 2008;5(1):25-36.
29. Wu MD, Atkinson TM1, Lindner JR. Platelets and von Willebrand factor in atherogenesis. *Blood.* 2017;129(11):1415-1419.
30. Whincup PH et al. von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2002; 23(22):1764-70.
31. Seaman CD, George KM, Ragni M, Folsom AR. Association of von Willebrand factor deficiency with prevalent cardiovascular disease and asymptomatic carotid atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Thrombosis research.* 2016;144:236-238.
32. Wu MD, Atkinson TM, Lindner JR1. Platelets and von Willebrand factor in atherogenesis. *Blood.* 2017; 16: 129(11):1415-1419.
33. Cannon C. Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. *Clin Cornerstone.* 2007;8(3):11-28.
34. Lusis A. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.
35. Bertomeu A, y Zambón D. La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *Med Integral* 2002;40(9):394-405.
36. Yurdagul A, Finney A. , Woolard M, Orr A. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem. J.* 2016; 473: 1281–1295
37. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res.* 2003 1;59(4):812-23.
38. Kirkby NS, Lundberg MH, Wright WR, Warner TD, Paul-Clark MJ, Mitchell JA. COX-2 Protects against Atherosclerosis Independently of Local Vascular Prostacyclin: Identification of COX-2 Associated Pathways Implicate Rgl1 and Lymphocyte Networks. Wallace J, ed. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e98165.
39. van Thienen JV, Fledderus JO, Dekker RJ, Rohlena J, van Ijendoorn GA, Kootstra NA, Pannekoek H, Horrevoets AJ. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res.* 2006; 72(2):231-40.

40. Ponnuswamy P, Schröttle A, Ostermeier E, et al. eNOS Protects from Atherosclerosis Despite Relevant Superoxide Production by the Enzyme in apoE<sup>-/-</sup> Mice. Lenting PJ, ed. PLoS ONE. 2012;7(1):e30193.
41. Nakajima T. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. J Periodontal Res. 2010;45(1):116-22.
42. Olsen I, Progulske-Fox A. Invasion of Porphyromonas gingivalis strains into vascular cells and tissue. Journal of Oral Microbiology. 2015;7:10.3402/jom.v7.28788.
43. Hayashi C, Viereck J, Hua N, et al. Porphyromonas gingivalis Accelerates Inflammatory Atherosclerosis in the Innominate Artery of ApoE Deficient Mice. Atherosclerosis. 2011;215(1):52-59. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.009.
44. Genco R, Van Dyke T. Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. Nat Rev Cardiol 2010;7 :479-480.
45. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a005058.
46. Fontanilla M, Espinosa L. In vitro and in vivo assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft. Tissue Eng Part A. 2012;18: 1857-1866.
47. Sun T, Jackson S, Haycock JW, et al. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. J Biotechnol. 2006;122:372-381.
48. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. Journal of Cell Science. 2012;125(13):3015-3024.
49. Methe H, Nugent HM, Groothuis A, Seifert P, Sayegh MH, Edelman ER. Matrix embedding alters the immune response against endothelial cells in vitro and in vivo. Circulation 2005;112(9):189-95.
50. Hess S, Methe H, Kim JO, Edelman ER. NF-kappaB activity in endothelial cells is modulated by cell substratum interactions and influences chemokine-mediated adhesion of natural killer cells. Cell Transplant 2009;18(3):261-273.
51. Orr et al. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. J Cell Biol. 2005; 169: 191-202
52. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K. Porphyromonas gingivalis modulates the production of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 in human vascular endothelial cells. Curr Microbiol. 2003;46(2):109-14.

53. Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M. Porphyromonas gingivalis stimulates monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;62(1):57-65.
54. Briones M, Phillips D, Renshaw M, Hooper W. Expression of chemokine by human coronary-artery and umbilical-vein endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *Coron Artery Dis.* 2001 May;12(3):179-86
55. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis.* 2012 Mar;221(1):2-11.
56. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986;1:48-57.
57. Gualtero DF et al. Rosuvastatin Inhibits Interleukin (IL)-8 and IL-6 Production in Human Coronary Artery Endothelial Cells Stimulated With Aggregatibacter actinomycetemcomitans Serotype b. *J Periodontol.* 2017;88(2):225-235.
58. Teng B et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1998; 275:G342-51.
59. Tan X, Essengue S, Talreja J, Reese J, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine directly and synergistically with lipopolysaccharide stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I(2) and E(2) production in human coronary artery endothelial cells. *J Immunol.* 2007;179(11):7899-906.
60. Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(28):5658-67.
61. Bernau S. Propiedades pro inflamatorias de lipopolisacárido de Eikenella corrodens y su capacidad para inducir disfunción endotelial. Tesis de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas-Universidad El Bosque, 2014
62. Hussain M, Stover CM, Dupont A. P. gingivalis in Periodontal Disease and Atherosclerosis – Scenes of Action for Antimicrobial Peptides and Complement. *Frontiers in Immunology.* 2015;6:45.
63. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research.* 2016;118(4):620-636.
64. Pollreis A, Huang Y, Roth GA, Cheng B, Kerschull M et al. Enhanced monocyte migration and pro-inflammatory cytokine production by Porphyromonas gingivalis infection. *J Periodontal Res.* 2010 Apr;45(2):239-45.
65. Cuccurullo C, Fazio ML, Mezzetti A, Cipollone F. COX-2 expression in atherosclerosis: the good, the bad or the ugly?. *Curr Med Chem.* 2007;14(15):1595-605.
66. Chou H-H, Yumoto H, Davey M, et al. Porphyromonas gingivalis Fimbria-Dependent

- Activation of Inflammatory Genes in Human Aortic Endothelial Cells . *Infection and Immunity*. 2005;73(9):5367-5378. doi:10.1128/IAI.73.9.5367-5378.2005.
67. Li P, Zhang D, Wan M, Liu J. PPAR $\gamma$  affects nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells exposed to *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. 2016; 68:116-22.
  68. Sun W, Wu J, Lin L, Huang Y, Chen Q, Ji Y. *Porphyromonas gingivalis* stimulates the release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthases and inhibiting endothelial nitric oxide synthases. *J Periodontal Res*. 2010;45(3):381-8.
  69. Wu C, Guo S, Niu Y, et al. Heat-shock protein 60 of *Porphyromonas gingivalis* may induce dysfunction of human umbilical endothelial cells via regulation of endothelial-nitric oxide synthase and vascular endothelial-cadherin. *Biomedical Reports*. 2016;5(2):243-247.
  70. Luscinskas, F. W., R. E. Gerszten, E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. J. Gimbrone, A. D. Luster, and A. Rosenzweig. 2000. C-C and C-X-C chemokines trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902:288–293
  71. Dawson TC. Kuziel WA. Osahar TA. Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1999;143:205–211.
  72. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, et al. (2010) The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol* 10: 5.
  73. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, et al. The Capsule of *Porphyromonas gingivalis* Leads to a Reduction in the Host Inflammatory Response, Evasion of Phagocytosis, and Increase in Virulence . Bliska JB, ed. *Infection and Immunity*. 2011;79(11):4533-4542.



