



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Desarrollo de un modelo celular endotelial tridimensional para la
evaluación del efecto de LPS de *Porphyromonas gingivalis* en la
expresión de algunos marcadores inflamatorios**

DIEGO FERNANDO GUALTERO ESCOBAR

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades
Doctorado en Biotecnología
Bogotá D.C, Colombia
2018

Desarrollo de un modelo celular endotelial tridimensional para la evaluación del efecto de LPS de *Porphyromonas gingivalis* en la expresión de algunos marcadores inflamatorios

Diego Fernando Gualtero Escobar

Tesis doctoral presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Director (a):

Marta Raquel Fontanilla Duque. Ph.D

Profesora Titular

Línea de Investigación:

Biotecnología en salud

Grupos de Investigación:

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos (UNAL)

Unidad de Investigación Básica Oral (UEB)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades

Doctorado en Biotecnología

Bogotá D.C, Colombia

2018

Dedicado a:

A Dios.

A mis Padres, pero en especial a mi madre Argelia Escobar de Gualtero que siempre quiso que fuera un doctor (médico). Creo que de alguna manera se lo cumplí.

A Nadia Yadira Castañeda García..

A Claudia Marcela Gonzalez Pineda.

A mis amados Hijos, Juan Diego Gualtero Castañeda y Samuel David Gualtero González. Ojalá encuentren un camino que los lleve a descubrir lo fascinante de la naturaleza y la vida para que lo sigan con pasión y encuentren la felicidad.

Este estudio es dedicado a ellos porque durante mi formación doctoral me enriquecieron en otros aspectos de mi vida: En lo espiritual, como hijo, esposo y padre. Gracias por brindarme su amor, tiempo, comprensión y compañía durante este periodo de mi vida.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación y mi formación doctoral se hizo posible gracias a la colaboración de las siguientes personas:

A mi directora de tesis, la Profesora Marta Raquel Fontanilla Duque, directora del Grupo de Ingeniería de Trabajo de la Universidad Nacional de Colombia, quien me apoyó con la consolidación de la propuesta de investigación y por su revisión crítica de los diferentes documentos escritos generados durante este trabajo. Igualmente debo agradecer a su equipo de trabajo: Ronald Jiménez, Diana Millán, Eduard Suesca quienes me brindaron en algún momento apoyo técnico.

Al Doctor Miguel Otero Cadena, Vicerrector de investigaciones de la Universidad El Bosque, por brindarme su apoyo y avalar ante la Universidad la financiación de las matrículas de mi formación doctoral. Sin su confianza no hubiera podido cumplir con esta meta.

A la Doctora Gloria Ines Lafaurie Villamil, Directora de la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque, por abrirme un espacio en su grupo de investigación desde donde he podido consolidar mi carrera como docente e investigador; además por su asesoría en el análisis estadístico de esta investigación.

A los profesores del comité tutorial Jaime E Castellanos y Luis A Gómez del doctorado en Biotecnología por su orientación académica durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros, docentes e investigadores de UIBO, que me apoyaron de manera técnica, académica, otros con su tiempo y consejos para llevar de la mejor manera mi estudio y trabajo.

Al Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología-COLCIENCIAS- por financiar el proyecto de investigación “Efecto de soportes de colágeno en un modelo de cultivo endotelial tridimensional (3D) en la respuesta inducida por *Porphyrromonas gingivalis*” convocatoria de salud 657 de Colciencias. Código COLCIENCIAS: 130865741090, Contrato: 608-2014. Esto hizo posible la obtención de recursos materiales (reactivos y equipos) para el desarrollo de esta tesis.

Resumen

Se desarrolló un cultivo endotelial tridimensional sobre soportes de colágeno I (3DCE) para evaluar la respuesta inflamatoria y función endotelial inducida por lipopolisacáridos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*; y compararla con cultivos bidimensionales (2DCE). Los cultivos 3DCE y 2DCE fueron estimulados con 1 µg/mL de LPS-P.g por 24 horas. Como control se utilizaron cultivos sin estimular. Además, se comparó en ambos modelos la respuesta inducida por LPS aislado de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Se evaluó la expresión de genes IL-8, MCP-1, COX-2, eNOS, vWF, la secreción de 40 citoquinas y prostaglandinas (PGI₂ y TXA₂), y la adhesión de monocitos. Los experimentos se realizaron por triplicado y las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$. En 3DCE se observó una disminución en la transcripción de COX-2, eNOS y vWF inducida por ambos LPS, mientras que se incrementó IL-8 y MCP-1 solamente con LPS-A.a. En 2DCE la transcripción de COX-2, IL-8 y MCP-1 se incrementó por LPS-A.a pero no por LPS-P.g. La secreción de 12 citoquinas en 3DCE fue incrementada comparado con el cultivo 2DCE en los controles. El tratamiento con LPS-A.a en 3DCE incrementó la secreción de IL-8, RANTES, G-CSF, ICAM-1, IL-6 y TXA₂; mientras que en 2DCE se incrementaron G-CSF, IL-8, RANTES, ICAM-1, TNF-RI, PGI₂ y TXA₂. La adhesión de monocitos al cultivo 2DCE fue incrementada tras el estímulo con LPS-A.a pero no en el cultivo 3DCE. LPS-P.g no indujo la secreción de citoquinas, prostaglandinas y adhesión de monocitos. El cultivo 3DCE refleja un comportamiento influenciado por el entorno tridimensional, lo que permite exhibir diferentes respuestas celulares frente a LPS de periodontopatógenos.

Palabras clave: (técnicas de cultivo celular, biomateriales, soportes, colágeno, célula endotelial, lipopolisacarido, mediadores de inflamación).

Abstract

A three-dimensional endothelial culture on collagen I scaffold (3DCE) was developed to evaluate the inflammatory response and endothelial function induced by lipopolysaccharides (LPS) of *Porphyromonas gingivalis*; and compare it with two-dimensional cultures (2DCE). The 3DCE and 2DCE cultures were stimulated with 1 µg / mL of LPS-P.g for 24 hours. As a control, cultures without stimulation were used. In addition, the LPS-induced response isolated from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was compared in both models. The expression of IL-8, MCP-1, COX-2, eNOS, vWF genes, secretion of cytokines and prostaglandins (PGI2 and TXA2), and monocyte adhesion were evaluated. The experiments were performed in triplicate and the differences were considered significant with a $p < 0.05$. In 3DCE a decrease in the transcription of COX-2, eNOS and vWF induced by both LPS was observed, while IL-8 and MCP-1 was increased only with LPS-A.a. In 2DCE the transcription of COX-2, IL-8 and MCP-1 was increased by LPS-A.a but not by LPS-P.g. The secretion of 12 cytokines in 3DCE was increased compared to 2DCE culture in the controls. Treatment with LPS-A.a in 3DCE increased the secretion of IL-8, RANTES, G-CSF, ICAM-1, IL-6 and TXA2; while in 2DCE G-CSF, IL-8, RANTES, ICAM-1, TNF-RI, PGI2 and TXA2 were increased. Monocyte adhesion to 2DCE culture was increased after stimulation with LPS-A.a but not in 3DCE culture. LPS-P.g did not induce the secretion of cytokines, prostaglandins and monocyte adhesion. The 3DCE culture reflects a behavior influenced by the three-dimensional environment, which allows different cell responses to be exhibited against LPS of periodontopathogens.

Keywords: Cell culture, Scaffold, Collagen, biomaterial, endothelial cell, lipopolysaccharide, inflammation

Contenido

	<u>Pág.</u>
<u>Resumen</u>	IV
<i>Lista de Figuras</i>	VIII
<i>Lista de Tablas</i>	IX
1. <u>Introducción</u>	10
2. <u>Marco Teórico</u>	13
2.1 <u>Endotelio y Función Endotelial</u>	13
2.2 <u>Disfunción Endotelial Inflamatoria</u>	17
2.3 <u>Enfermedad Periodontal y Riesgo Cardiovascular</u>	18
2.4 <u>Lipopolisacáridos de Porphyromonas gingivalis</u>	21
2.5 <u>Características de los Cultivos Celulares</u>	25
2.6 <u>Modelos Celulares In Vitro Empleados Para Estudiar Disfunción Endotelial Inducida por Bacterias Orales Patógenas</u>	26
2.7 <u>Limitaciones de los Actuales Modelos Celulares In Vitro Para el Estudio de Disfunción Endotelial</u>	31
2.8 <u>Cultivos Celulares Tridimensionales</u>	32
2.9 <u>Transición Endotelial-Mesenquimal de la Célula Endotelial (TEnM)</u>	38
2.10 <u>Ventajas y Desventajas de los Cultivos 3D</u>	39
2.11 <u>Planteamiento del Problema y Justificación</u>	40
2.12 <u>Hipótesis</u>	42
3. <u>Objetivo General y Específicos</u>	43
4. <u>Metodología</u>	44
4.1 <u>Elaboración de Soportes de Colágeno I</u>	44
4.2 <u>Cultivo Celular</u>	44
4.3 <u>Cultivos Tridimensionales (3D) de Células Endoteliales</u>	45
4.4 <u>Análisis Morfológico de Células Endoteliales Cultivadas Sobre Soportes de Colágeno</u>	46
4.5 <u>Viabilidad Celular de los Cultivos 3D</u>	46
4.6 <u>Respuesta Inflamatoria de Células Endoteliales Cultivadas Sobre Soportes de Colágeno</u>	47
4.7 <u>Proliferación de HCAEC Sobre Soportes de Colágeno</u>	47
4.8 <u>Determinación de Valores de Resistencia Eléctrica Trans-Endotelial</u>	47

<u>del Cultivo Celular Tridimensional</u>	47
4.9 <u>Identificación de Marcadores Endoteliales en Células HCAEC Cultivadas Sobre Soportes de Colágeno Por Microscopía de Fluorescencia</u>	48
4.10 <u>Purificación de Lipopolisacáridos de Periodontopatógenos</u>	48
4.11 <u>Estimulación de Cultivos 3D de Células HCAEC con LPS de Periodontopatógenos</u>	49
4.12 <u>Evaluación de la Transcripción de Genes que Codifican Factores Asociados con Disfunción Endotelial</u>	50
4.13 <u>Cuantificación de Factores Solubles en Cultivos 3DCE, 2DCE y Estimulados con LPS de Periodontopatógenos</u>	52
4.14 <u>Ensayo de Adhesión de Monocitos THP-1 a Células HCAEC</u>	52
4.15 <u>Cuantificación de TXA2 y PGI2 Mediante Prueba ELISA</u>	53
4.16 <u>Análisis Estadístico</u>	53
5. <u>Resultados</u>	55
5.1.1 <u>Características Macro y Microscópicas de Soportes de Colágeno I en Insertos Transwell</u>	55
5.1.2 <u>Caracterización de Cultivos Endoteliales Tridimensionales</u>	57
5.1.3 <u>Evaluación de la viabilidad celular en los cultivos 3D</u>	59
5.1.4 <u>Evaluación de la secreción basal de citoquinas pro-inflamatoria en los cultivos 3D</u>	60
5.1.5 <u>Análisis histológico de cultivos de células HCAEC sembradas en soportes no entrecruzados de colágeno I y Geltrex obtenidos después de congelar a -80°C</u>	61
5.1.6 <u>Microscopía de fluorescencia de HCAEC cultivadas en 3D</u>	62
5.1.7 <u>Efecto del LPS de Periodontopatógenos en las Interacciones Célula-Célula en el Cultivo 3DCE</u>	66
5.1.8 <u>Resistencia transepitelial de los cultivos 3D</u>	67
5.1.9 <u>Evaluación de la proliferación celular</u>	68
5.2 <u>Caracterización de LPSs Purificados de Periodontopatógenos</u>	68
5.3 <u>Inducción de la Transcripción de Genes de Quimoquinas por LPS de Periodontopatógenos</u>	70
5.4 <u>Inducción de la Transcripción de Genes de Función Endotelial por LPS de Periodontopatógenos</u>	71
5.5 <u>Perfil de Secreción de Citoquinas en los Modelos 2DCE y 3DCE y Análisis de Componentes Principales (APC)</u>	73
5.6 <u>Análisis del Perfil de Secreción de Citoquinas en los Modelos 2DCE y 3DCE</u>	76
5.7 <u>Adhesión de Monocitos a HCAEC Estimuladas con LPS de Periodontopatógenos</u>	80
5.8 <u>Evaluación de la Secreción de Prostaciclina y Tromboxano en Cultivos 2DCE y 3DCE Estimulados con LPS de Periodontopatógenos</u>	81
6. <u>Discusión</u>	83
7. <u>Conclusión</u>	91
8. <u>Bibliografía</u>	92
9. <u>Anexos</u>	107
9.1 <u>Artículo 1</u>	
9.2 <u>Artículo 2</u>	
9.3 <u>Artículo 3</u>	

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
<u>Figura 1.</u> Representación estructural del endotelio, lamina basal e íntima	14
<u>Figura 2.</u> Representación esquemática de lipopolisacáridos sobre membranas externas de microorganismos Gram-negativos	23
<u>Figura 3.</u> Mecanismos plausible de disfunción endotelial inducida por periodontopatógenos	31
<u>Figura 4.</u> Diseño de soportes de colágeno I elaborados sobre Insertos Transwell	55
<u>Figura 5.</u> Imágenes estereoscópicas de soportes de colágeno I	56
<u>Figura 6.</u> Microscopía electrónica de transmisión de soportes de colágeno I (5 mg/mL) no entrecruzados	57
<u>Figura 7.</u> Microscopia de luz de cultivos 3D de células endoteliales de arteria coronaria humana	58
<u>Figura 8.</u> Microscopía de fluorescencia de cultivos 3D de células HCAEC	59
<u>Figura 9.</u> Viabilidad de las HCAEC en los cultivos 3D	59
<u>Figura 10.</u> Concentración basal de citoquinas pro-inflamatorias en los cultivos 3D	60
<u>Figura 11.</u> Análisis histoquímico de los cultivos 3D	61
<u>Figura 12.</u> Análisis con microscopia de fluorescencia de la distribución celular en la superficie apical de los cultivos 3D	62
<u>Figura 13.</u> Observaciones con microscopía de fluorescencia de la superficie apical del cultivo 3DGCE	63
<u>Figura 14.</u> Observaciones con microscopía de fluorescencia de la superficie apical del cultivo 3DCE	64
<u>Figura 15.</u> Observaciones con microscopía de fluorescencia del cultivo 2D	65
<u>Figura 16.</u> Inmunodetección del factor Von Willebrand (vWF) en la superficie apical del cultivo 3DCE	65
<u>Figura 17.</u> Imágenes Fluorescentes del cultivo 3DCE tratado con LPS de periodontopatógenos	66
<u>Figura 18.</u> Resistencia Eléctrica Trans-Endotelial (TEER)	67
<u>Figura 19.</u> Curva de proliferación de células HCAEC sembradas en soportes de colágeno I	68
<u>Figura 20.</u> Caracterización de LPS aislado de <i>P. gingivalis</i> W83	69
<u>Figura 21.</u> Caracterización de LPS aislado de <i>A. actinomycetemcomitans</i> 29522	70
<u>Figura 22.</u> Evaluación por RT-qPCR de la transcripción de los genes MCP-1 e IL-8	71
<u>Figura 23.</u> Evaluación por RT-qPCR de la transcripción de los genes COX2, eNOS y vWF	73
<u>Figura 24.</u> Análisis de componentes principales	76
<u>Figura 25.</u> Secreción de quimioattractantes en los cultivos 2DCE y 3DCE	77
<u>Figura 26.</u> Evaluación de la secreción de citoquinas en el cultivo 2DCE y 3DCE luego del estímulo con LPS de periodontopatógenos	78
<u>Figura 27.</u> Ensayo de adhesión de monocitos THP-1 a células HCAEC cultivadas en 2D y 3D, estimuladas con LPS de periodontopatógenos	80
<u>Figura 28.</u> Secreción de la molécula de adhesión ICAM-1 en los cultivos 2D y 3D estimuladas con LPS de periodontopatógenos	81
<u>Figura 29.</u> Secreción de PGI ₂ y TXA ₂ en cultivos 2DCE y 3DCE estimulados con LPS de periodontopatógenos	82

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
<i>Tabla 1. Algunos Componentes de Matriz Extracelular Usados para Elaborar Soportes Tridimensionales</i>	33
<i>Tabla 2. Diferencias en el comportamiento celular entre modelos 2D y 3D</i>	36
<i>Tabla 3. Secuencia de primers y genes amplificados</i>	51
<i>Tabla 4. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos 2DCE/3DCE y tratados con LPS de periodontopatógenos</i>	75
<i>Tabla 5. Mayores diferencias en la secreción de citoquinas en HCAEC cultivadas en modelos 2D y 3D frente al estímulo de LPS de periodontopatógenos</i>	79

1. INTRODUCCIÓN

Porphyromonas gingivalis y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son bacterias Gram negativas localizadas en la biopelícula subgingival, cuya presencia resulta en gingivitis. Cuando no es controlada, la gingivitis conduce a la enfermedad periodontal; inflamación crónica caracterizada por la pérdida de los tejidos que soportan los dientes (Socransky et al. 1998). La enfermedad periodontal es un factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La plausibilidad de esta asociación se basa en las frecuentes bacteriemias y endotoxemias ocasionadas por estas bacterias periodontopatógenas, en su presencia en la placa aterosclerótica y en la respuesta inflamatoria que inducen en los pacientes (Kozarov et al. 2005; Lafaurie et al. 2007; Reyes et al. 2013; Bartova et al. 2014; Kurita-Ochiai and Yamamoto 2014).

Los cultivos *in vitro* de células endoteliales (CE) han sido utilizados comúnmente para dilucidar mecanismos de la patogenia inducida por periodontopatógenos y sus factores de virulencia (Erridge et al. 2007; Nakamura et al. 2008; Ho et al. 2016; Gualtero et al. 2017). En ellos, las células son sembradas en placas de poliestireno con el fin de que se adhieran y proliferen para formar una monocapa confluyente en dos dimensiones (cultivos 2D). Modelos celulares basados en cultivos 2D han permitido estudiar la interacción célula endotelial-bacteria (e.g.: adhesión, colonización, migración, inducción de apoptosis o muerte celular, etc) y proponer mecanismos asociados con la disfunción endotelial (Kebuschull et al. 2010). En estos modelos las células endoteliales no se adhieren a componentes de la membrana basal que *in vivo* subyace al endotelio; por eso, las funciones que normalmente realizan en los tejidos de donde provienen pueden verse afectadas (Baker and Chen 2012).

La ingeniería de tejidos ha permitido el diseño y producción de soportes tridimensionales (3D) elaborados con componentes de matriz extracelular, que favorecen el cultivo celular 3D en ambientes más fisiológicos que los aportados por los platos de cultivo celular de poliestireno. Con ellos se producen sustitutos tisulares que favorecen procesos de regeneración (Panduwawala et al. 2017) y modelos para el estudio *in vitro* de diferentes

procesos en que intervienen las células. En los cultivos 3D las interacciones célula-sustrato y célula-célula, el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular son favorecidos por la presencia de proteínas de la matriz extracelular (MEC) natural de los tejidos y por características fisicoquímicas, micro estructurales y mecánicas de los soportes que contribuyen a crear un microambiente más parecido al que interactúa naturalmente con la célula *in vivo* (Kadowaki et al. 2010; Huang et al. 2013).

La evidencia es cada vez mayor de que el comportamiento de las células endoteliales en cultivos 2D y 3D es diferente. Por ejemplo, en cultivos de células endoteliales sobre matrices de colágeno y fibrina expuestos a *Staphylococcus aureus* la secreción de factor tisular (TF) fue significativamente mayor y la secreción de MCP-1 e IL-8, la adhesión de monocitos y la actividad pro-coagulante fue significativamente menor, que en las células cultivadas en 2D (Heying et al. 2012). Igualmente, cultivos 3D de células endoteliales sobre soportes de fibrina y colágeno mostraron una respuesta inflamatoria y procoagulante inducida por *Staphylococcus aureus* menor que la observada en los cultivos 2D de estas células (Heying et al. 2012). En otro estudio se demostró que células endoteliales embebidas en geles de colágeno presentan diferencias estructurales en el citoesqueleto comparado con las células cultivadas sobre superficies planas en 2D. Además, Al ser expuestos estos cultivos a TNF- α se observó una menor secreción de MCP-1 en el cultivo 3D comparado con el cultivo 2D. Por último, factores solubles provenientes del cultivo 3D fueron capaces de disminuir el reclutamiento de monocitos a monocapas de células endoteliales en un modelo de inflamación (Indolfi et al. 2012). Aunque los modelos 3D mencionados son cultivos estáticos que no consideran las tensiones causadas en el endotelio por el torrente sanguíneo, arrojan resultados diferentes a los que proporcionan los cultivos 2D (Kutys and Chen 2016).

Hasta donde sabemos, la respuesta inflamatoria de CE cultivadas en micro entornos tridimensionales expuestos a microorganismos periodontopatógenos no ha sido estudiada. En este contexto, el desarrollo de un modelo 3D basado en el cultivo de células endoteliales sobre soportes hechos de componentes de matriz extracelular de la membrana basal del endotelio, puede proporcionar una herramienta para el estudio de la respuesta inmune relacionada con aterosclerosis en un ambiente más cercano al endotelial (Gualtero et al.

2018). En el presente estudio se diseñaron y desarrollaron soportes de colágeno tipo I para el cultivo tridimensional de células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC), se caracterizaron diferentes cultivos 3D. El cultivo 3D que presentó mejores características fue estimulado con LPS aislado de *Porphyromonas gingivalis* W83, se evaluaron biomarcadores de respuesta pro-inflamatoria y de disfunción endotelial. Igualmente, se hizo una comparación de la respuesta pro-inflamatoria entre los cultivos 2D y 3D. Adicionalmente se evaluó la respuesta inducida por LPS-A.a en ambos modelos y se comparó con la inducida por LPS-P.g.

Los resultados de este trabajo muestran que en el modelo 3D desarrollado las células HCAEC exhiben un perfil de secreción de citoquinas diferente al perfil de secreción de las HCAEC cultivadas bidimensionalmente en placas de poliestireno. Igualmente, se observaron diferencias en la expresión de genes relacionados con función endotelial luego del estímulo con LPS.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Endotelio y Función Endotelial

El endotelio es la monocapa de células que recubre internamente al tejido vascular. Expuesto a los fluidos circulatorios y a las células circulantes, funciona como barrera de permeabilidad selectiva impidiendo la extravasación de la sangre y de la linfa (Mehta and Malik 2006). Es considerado un órgano vital porque regula y mantiene la fisiología cardiovascular; por eso, su disfunción está relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El endotelio vascular está conformado por una monocapa confluyente de células endoteliales, lámina basal y tres zonas claramente diferenciadas: íntima, media y adventicia. Durante la formación de los vasos sanguíneos, las células endoteliales y los pericitos producen la lámina basal que reposa sobre la íntima. La lámina basal se encuentra constituida por componentes de matriz extracelular como colágenos tipo IV, laminina y entactina. La íntima es una matriz acelular compleja constituida por colágenos fibrilares tipo I, III, y proteoglicanos producida por fibroblastos (Figura 1). La lámina basal y la íntima proporcionan la rigidez, porosidad y topografía requerida para que el endotelio soporte las tensiones del fluido sanguíneo y mantenga su integridad (Stratman and Davis 2012). La íntima conecta con la media, la cual está conformada por células musculares lisas y una matriz extracelular rica en colágeno y elastina; la capa más externa del tejido vascular, es la adventicia rica en fibroblastos. Las alteraciones del microentorno del endotelio afectan su funcionalidad y pueden conducir a patologías cardiovasculares, como la aterosclerosis (Yurdagul et al. 2016).

La lámina basal tiene un espesor de 80-100 nm y forma un colchón alrededor de la monocapa endotelial, que soporta la arquitectura vascular. La unión de las células endoteliales a la membrana basal, las polariza haciendo que la membrana celular en contacto con ella - basolateral- exprese proteínas diferentes a las encontradas en la membrana luminal de las

células. Por su estrecha interacción, la lámina basal modifica el comportamiento de la célula endotelial y la regula durante la angiogénesis (Kubota et al. 1988; Grant et al. 1990).

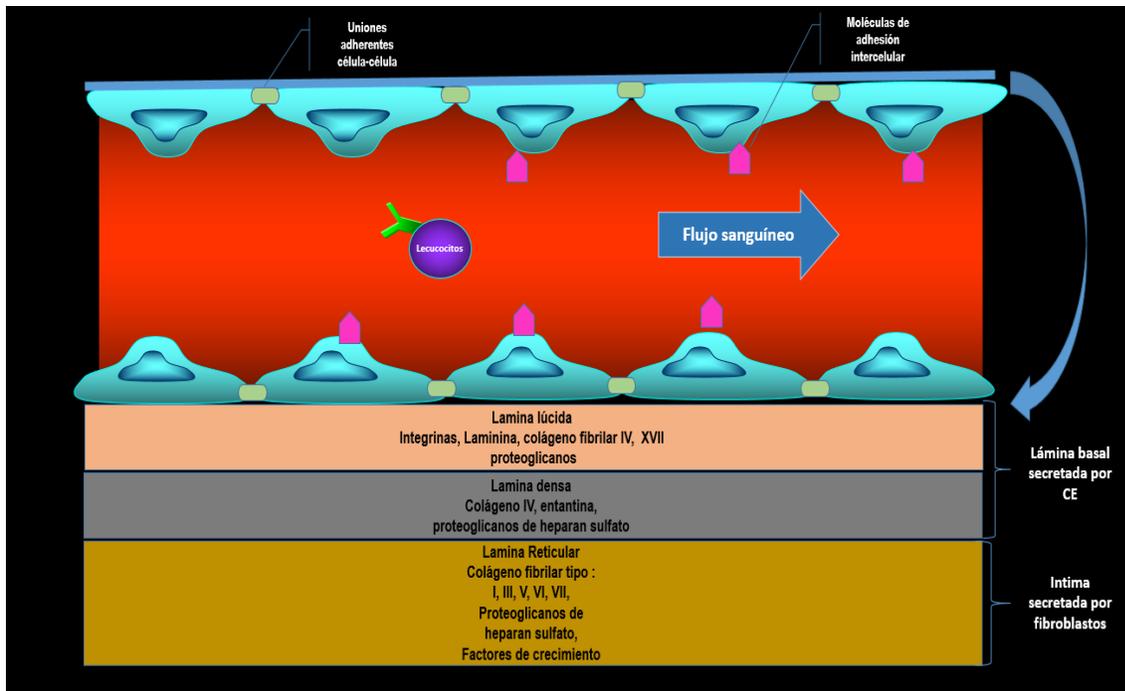


Figura 1. Representación estructural del endotelio, lámina basal e íntima. Elaborado por Gualtero D.F.

La lámina basal soporta a los epitelios y al endotelio. Sus componentes principales son el colágeno tipo IV, la laminina, la entactina y proteoglicanos derivados de heparan sulfato. El colágeno IV es el más abundante e induce la adherencia y proliferación celular a través de receptores de integrina. La laminina induce migración, crecimiento y diferenciación celular. La entactina es una glicoproteína que se une fuertemente a la laminina modificando su unión a las células. Los proteoglicanos de heparan sulfato forman un campo aniónico que evita el paso de macromoléculas a la célula. El colágeno se une a las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, mientras que la laminina se une a las integrinas $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ presentes en las células endoteliales (Grant et al. 1990; Lampugnani et al. 1991). Normalmente en la lámina basal no se encuentran fibronectina y fibrinógeno, estas proteínas solo son depositadas luego del daño endotelial. La fibronectina se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ mientras que el fibrinógeno se une a la integrina $\alpha v\beta 3$, desencadenando la proliferación y migración de las células endoteliales durante los procesos de remodelamiento o reparación del endotelio.

Las proteínas de MEC contienen motivos de unión (ej; secuencias RGD) a las integrinas presentes en las células que al ser reconocidos permiten la adhesión celular. La interacción con las proteínas de la MEC señala a las células y les permite organizarse y responder a cambios del entorno extracelular ejerciendo funciones mecanotransductoras (Orr et al. 2005). Además, la MEC sirve como reservorio de factores solubles que proporciona señales claves para mantener el fenotipo celular. Por lo tanto, la MEC al ser un reservorio de factores solubles, no solo sirve de andamio al que se adhieren las células sino que también aporta señales claves en el microambiente donde las células residen influenciando su fenotipo, crecimiento, diferenciación y comportamiento celular (Li et al. 1987).

Las células endoteliales establecen uniones fuertes y estrechas mediante la expresión en membrana, de proteínas como ocludinas y cadherinas endoteliales vasculares (VE-cadherina). Estas proteínas intervienen en las uniones intercelulares debido a que conectan a las células a través de proteínas del citoesqueleto, como los filamentos de actina. Por lo anterior, las células endoteliales funcionan como barrera semipermeable que controla de manera selectiva la salida de componentes sanguíneos al tejido subyacente. Las VE-cadherinas forman complejos con las moléculas de adhesión célula endotelial plaqueta (PECAM-1), expresadas en las uniones intercelulares de las células endoteliales, facilitando procesos mecano-sensoriales del fluido sanguíneo y activando vías de señalización que favorecen procesos de reorganización del citoesqueleto y tensión intracelular (Komarova et al. 2017). Mecanismos de señalización inducidos por el flujo sanguíneo en el endotelio, inducen cambios conformacionales de PECAM-1 que activan procesos de señalización intracelular mediados por las quinasas PI3K y AKT. Estos resultan en la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) que cataliza la producción de óxido nítrico (ON); el cual, relaja a las células musculares lisas relajando al tejido endotelial (Ibid). Además de cumplir la función de barrera y participar en los mecanismos de vasodilatación en el endotelio, las células endoteliales cumplen otras funciones celulares relacionadas con: producción de moléculas anti-trombóticas y pro-trombóticas; inflamación; adhesión y migración de monocitos, neutrófilos y plaquetas; catabolismo de lipoproteínas de baja densidad (LDL); angiogénesis; proliferación celular y homeostasis del tejido vascular (Félétoú 2011). A través de la acción de enzimas ciclo-oxigenasas (COX), el ácido

araquidónico puede ser metabolizado a prostaglandinas -como PGI₂- que cumplen funciones vasodilatadoras y anti-agregantes, o hacia la síntesis de leucotrienos -como TXA₂- que ejercen funciones vasoconstrictoras, inflamatorias, y pro-agregantes de leucocitos y plaquetas al endotelio; por esta razón, su presencia se ha relacionado con aterosclerosis (Egan et al. 2005).

El endotelio sano expuesto al flujo sanguíneo tiene actividad anti-trombótica y anti-coagulante, debido principalmente a tres mecanismos: (i) La secreción de prostaciclina (PGI-2), óxido nítrico y ADP-difosforilasa, sustancias que previenen la adhesión de las plaquetas al endotelio sano; (ii) La expresión de heparan sulfato, proteoglicano asociado a membrana, que se une y activa a la proteasa antitrombina III para que degrade a la trombina y a los factores de la coagulación IXa y Xa, críticos en la conversión de protrombina a trombina; (iii) La expresión de trombomodulina, proteína integral de membrana que se une a la trombina para formar un complejo que reconoce y activa a la proteína C, la cual degrada a los factores de la coagulación Va y VIIIa (Félétou 2011).

El factor tisular (TF) expresado por células vasculares y no vasculares (monocitos, células del músculo liso y queratinocitos), es uno de los componentes claves del proceso de coagulación. Las células endoteliales no expresan el TF, como un mecanismo de seguridad para evitar procesos de coagulación debido a estímulos del flujo laminar y cortante de la sangre. Las plaquetas son activadas por la trombina generada en las células que expresan TF, lo que induce liberación de calcio y la unión de proteínas de la cascada de coagulación por la exposición de fosfatidilserina en la membrana celular externa de las plaquetas. La trombina además libera el factor von Willebrand del factor VIII, lo que induce la adhesión de plaquetas y agregación. La propagación de la cascada lleva a la activación del factor X (FXa), el cual se une al FVa en las plaquetas y activa más trombina; esta proteína activada cliva el fibrinógeno produciendo una matriz de fibrina insoluble (Félétou 2011). Las células endoteliales regulan la coagulación, ya que al asociar trombina con trombomodulina en su superficie desencadenan la activación de la proteína C y su cofactor S, encargados de la degradación de los factores Va y VIIIa; la degradación de estos últimos evita la generación de nueva trombina. También, porque secretan el factor von Willebrand que facilita la unión

y agregación de las plaquetas al endotelio. En procesos patológicos el endotelio no expresa las moléculas que regulan la activación de trombina y aumenta la secreción del factor von Willebrand y de moléculas de adhesión de monocitos (Kawecki et al. 2017).

El papel que el endotelio cumple cesa cuando el tejido endotelial se lesiona o sufre estrés por el flujo sanguíneo, cambios en las presiones, presencia de sustancias reactivas de oxígeno y nitrógeno, infección e inflamación (Gimbrone 2010; Cho et al. 2018). Bajo estas condiciones la célula endotelial cambia su perfil anti-trombótico y anti-coagulante por uno trombótico e inflamatorio induciendo la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina), secreción de compuestos pro-coagulantes como el Factor de von Willebrand (vWF), y tromboxano A2 (TXA2) (Egan et al. 2005; Abadier et al. 2015; Noone et al. 2016).

2.2 Disfunción Endotelial Inflamatoria

La disfunción endotelial es un término utilizado para referirse a condiciones patológicas que implican alteraciones en la función anti-inflamatoria y anti-trombótica del endotelio. Se evidencia por la reducción de óxido nítrico (NO) y el incremento de tromboxano A2 un factor de contracción liberado por el endotelio y que causa agregación de plaquetas (Kawashima and Yokoyama 2004; Gautier-Veyret et al. 2015). Estas alteraciones han sido asociadas con inflamación crónica y aterosclerosis (Egan et al. 2005; Gimbrone and García-Cardena 2016).

La aterosclerosis es una patología caracterizada por la formación de lesiones en las arterias en las que típicamente se presenta inflamación, acumulación de lípidos, muerte celular y fibrosis. Las manifestaciones de la disfunción endotelial afectan a la pared arterial y están directamente relacionadas con la patogénesis de la aterosclerosis, entre estas se encuentran: permeabilidad a las lipoproteínas que permite su extravasación y acumulación en la íntima, reactividad vascular, reclutamiento de leucocitos, acumulación de células espumosas, disminución de la regeneración endotelial, incremento en la proliferación de las células de músculo liso y alteración del balance fibrinólisis / homeostasis (Libby et al. 2013).

La migración de monocitos y linfocitos a través del endotelio es uno de los eventos de disfunción endotelial relacionado con aterogénesis. La activación de la célula endotelial por citoquinas, agentes infecciosos o lipoproteínas oxidadas (oxLDL), induce una respuesta pro-aterosclerótica caracterizada por la secreción de citoquinas, quimoquinas y la expresión en superficie de moléculas de adhesión celular que inducen el reclutamiento y adhesión de células al endotelio activado y su posterior migración al sub-endotelio del tejido vascular (Libby et al. 2013). A pesar de los avances en la comprensión de la patogenia de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, aún no hay suficiente evidencia que explique cómo la inflamación e inmunidad intervienen en los procesos ateroscleróticos (Libby et al. 2011). La célula endotelial puede jugar un rol fundamental en la función inflamatoria del endotelio frente a infecciones por microorganismos orales.

2.3 Enfermedad Periodontal y Riesgo Cardiovascular

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria de origen infecciosa que afecta a los tejidos que soportan los dientes y que conduce a su pérdida. Los microorganismos asociados con esta patología son bacterias Gram negativas anaerobias, frecuentemente identificadas y aisladas de las bolsas subgingivales periodontales. Las especies más comunes son *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola*. La respuesta inmune inducida por los microorganismos a nivel subgingival, induce el daño de los tejidos blandos y causa sangrado debido a la permeabilización vascular (Socransky et al. 1998).

Parámetros clínicos periodontales como el sangrado observado cuando se realiza un sondaje, profundidad de las bolsas y pérdida de adhesión periodontal y ósea se asocian con enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Existe una tasa de riesgo asociada entre enfermedad periodontal y enfermedad cardiovascular coronaria (CHD) de 2.1 entre individuos jóvenes (21-59 años) (Dietrich et al. 2008). La posibilidad de que la enfermedad cardiovascular sea causada por la enfermedad periodontal, está relacionada con la presencia de microorganismos infecciosos periodontales en las lesiones que la caracterizan. Un estudio epidemiológico de enfermedad cardiovascular e infecciones orales (INVEST), en el que se excluyeron pacientes con otros factores de riesgo (alto índice de masa corporal, tabaquismo,

presión sistólica sanguínea, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y proteína C reactiva), asoció la presencia de bacterias periodontales de la placa subgingival con el grosor de la íntima-media carótida (IMT) (Desvarieux et al. 2005). También, en pacientes con enfermedad cardiovascular relacionada con aterosclerosis se ha establecido una asociación positiva (OR= 1,75; 95% intervalo de confianza (CI): 1.32 a 2.34; $p < 0.001$) entre niveles sistémicos de anticuerpos contra *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Mustapha et al. 2007). Estudios observacionales muestran una asociación clínica entre periodontitis, enfermedad cardiovascular aterosclerótica y disfunción endotelial sin embargo estos estudios no soportan una relación causal a pesar de que se ha demostrado una elevada presencia de *P. gingivalis* en lesiones ateroscleróticas (Holtfreter et al. 2013; Tonetti et al. 2013; Mougeot et al. 2017). Por lo tanto el rol de los microorganismos periodontopatógenos en la patogenia de la enfermedad aterosclerótica está aún por dilucidarse.

En la enfermedad periodontal es común el paso de bacterias de la cavidad oral al torrente sanguíneo luego de un proceso de masticación, cepillado o tratamiento periodontal generando bacteriemias y endotoxemias a nivel sistémico que inducen una respuesta pro-inflamatoria sub-clínica de naturaleza crónica (Geerts et al. 2002; Lafaurie et al. 2007; Castillo et al. 2011). El aumento en sangre de niveles de biomarcadores pro-ateroscleróticos como la *CRP*, *IL-6* y el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- α*), sugieren una asociación de estos dos biomarcadores con la enfermedad cardiovascular (Pussinen et al. 2007). Tonetti y colaboradores, demostraron que el tratamiento periodontal induce inflamación sistémica y disfunción endotelial a corto tiempo (24 horas), pero a largo plazo (6 meses) las reduce (Tonetti et al. 2007). Aunque el tratamiento periodontal puede disminuir los niveles de biomarcadores de inflamación sistémicos y de disfunción endotelial en estudios de corto tiempo, no hay evidencia de que prevenga eventos de enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Poco se conoce, sobre el efecto que controlar infecciones periodontales tiene en la reducción de la incidencia de eventos cardiovasculares.

Aunque la aterosclerosis es una enfermedad crónica multifactorial, la inflamación que ocurre en respuesta a las infecciones puede lesionar al endotelio generando placas que obstruyen la

circulación de la sangre. Por esta razón, se cree que la periodontitis puede ser un factor de riesgo importante en la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. De este modo, el paso intermitente de bacterias y sus endotoxinas al torrente sanguíneo y la respuesta inflamatoria sistémica resultante podría afectar de manera crónica al endotelio vascular (Genco and Van Dyke 2010). Periodontopatógenos como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* han sido identificados, aislados y cultivados a partir de lesiones ateroscleróticas de pacientes con enfermedad periodontal, aunque se desconoce su papel en el inicio de la lesión (Kozarov et al. 2005; Padilla et al. 2006). En este contexto, la evidencia sugiere que las infecciones por patógenos periodontales aumentan el riesgo cardiovascular aterosclerótico de manera indirecta, al inducir una respuesta sistémica pro-inflamatoria y daño del tejido vascularizado.

Se han descrito modelos animales de infección oral y sistémica con periodontopatógenos, para evaluar la relación entre el proceso infeccioso y la aterosclerosis. En ratones expuestos a bacterias vivas y muertas (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*), o a su LPS, se ha encontrado formación de placas ateroscleróticas (Lalla et al. 2003; T. Zhang et al. 2010; Jia et al. 2013). Estos ratones al ser sometidos a dietas no controladas hacen hiperlipidemias, debido a que no degradan quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) porque son deficientes en el gen que codifica la apo-proteína E (ApoE). Por eso, no constituyen un modelo apropiado para determinar la influencia de la infección por periodontopatógenos en la génesis de la aterosclerosis, ya que las hiperlipidemias también constituyen un factor de riesgo (Kramer et al. 2017).

En un modelo de infección crónica por periodontopatógenos en ratones con y sin alteraciones genéticas de ApoE, se demostró que la cepa W83 de *P. gingivalis* no induce formación de placas ateroscleróticas en ratones silvestres, pero sí induce una respuesta sistémica inflamatoria y altera el metabolismo de LDL y HDL, hechos que favorecen el inicio y progresión de la enfermedad aterosclerótica (Maekawa et al. 2011). Igualmente, que en ratones que no expresan ApoE (ApoE⁻) la infección con *P. gingivalis* aumenta el metabolismo de las lipoproteínas ricas en colesterol y la formación de placas ateroscleróticas en relación con animales ApoE⁻ no infectados. Estos resultados sugieren, que las infecciones por periodontopatógenos no inducen de manera directa la formación de placas

ateroscleróticas. En cerdos con niveles de colesterol controlados a los que se les inyectó *P. gingivalis* de diferentes cepas (A7436, FDC381), se observaron lesiones aórticas y coronarias similares a las ateroscleróticas; mientras que en cerdos hipercolesterolémicos, las placas ateroscleróticas fueron evidentes. Estos estudios fortalecen la hipótesis de que las bacterias periodontopatógenas potencian el daño vascular aterosclerótico (Brodala et al. 2005).

Porphyromonas gingivalis presenta diversidad de cepas por lo que es razonable pensar que sus efectos en el endotelio en relación a mecanismos ateroscleróticos sean dependientes de la cepa circulante. Los estudios experimentales han usado cepas que expresan fimbrias, demostrando que este factor de virulencia es uno de los mayores determinantes del efecto putativo pro-aterogénico de *P. gingivalis* (Gibson et al. 2004; Nakano et al. 2008). También, se ha demostrado que otros factores de virulencia pueden ser importantes en el proceso aterosclerótico debido a que cepas W83 de *P. gingivalis* deficientes en fimbria, promueven aterosclerosis en ratones deficientes de ApoE (Maekawa et al. 2011). A pesar de estos hallazgos, los datos proporcionados por los modelos animales sugieren que los microorganismos periodontopatógenos inducen respuestas relacionadas con aterosclerosis; sin embargo, no explican el papel que juega el endotelio sobre los mecanismos relacionados con la génesis del aterosclerosis inducida por microorganismos periodontales. Además, la reproducción de resultados a partir de modelos animales en estudios preclínicos está actualmente sujeta a discusión y validación (Macleod 2011; Anglemyer et al. 2015).

Resulta claro que el manejo de la inflamación crónica sistémica en pacientes con enfermedad periodontal, es un aspecto clave en la intervención de riesgo cardiovascular aterosclerótico. Por eso es necesario, llevar a cabo estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* que permitan esclarecer los mecanismos de esta asociación.

2.4 Lipopolisacáridos de *Porphyromonas gingivalis*: Estructura Reconocimiento y Respuesta Celular

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas donde cumplen funciones de membrana. Eventualmente pueden ser liberados en vesículas de membrana externa, reconocidas por receptores tipo toll (*TLR*)

presentes en las membranas celulares. Este reconocimiento, genera una respuesta inflamatoria que en algunas ocasiones conduce a un tipo de muerte celular conocida como piroptosis (Rietschel et al. 1994; Gu et al. 2018). Por ejemplo, infecciones por microorganismos Gram negativos como *Escherichia coli* generan endotoxemias (LPS en circulación sanguínea) y una fuerte respuesta inflamatoria que puede causar choque séptico y la muerte del individuo (Taylor et al. 1991). Llama la atención que endotoxemias causadas por el paso de bacterias periodontopatógenas desde la cavidad oral a la circulación (bacteriemia) en individuos con enfermedad periodontal, no causan una respuesta inflamatoria aguda sino crónica en el individuo. Es por esto, que se han relacionado las endotoxemias de periodontopatógenos con enfermedades inflamatorias crónicas como la aterosclerosis (Pussinen et al. 2007). Por lo anterior, la manera como las células reconocen las estructuras de los LPS de bacterias Gram negativas y generan una respuesta al proceso infeccioso hace parte de los mecanismos de patogenia que utilizan los microorganismos.

El LPS de Gram negativos posee tres regiones: i) Una región hidrofóbica que se ancla internamente en la membrana externa, denominada lípido A; ii) Una región central que contiene heptosas y un octilglucósido conocido como KDO, denominada núcleo, que a su vez se subdivide en núcleo interno y núcleo externo; iii) Una región externa constituida por polisacáridos, denominada antígeno O. Debido a que el KDO es un componente específico de los LPSs, ha sido utilizado para su identificación en procesos de purificación (Lee and Tsai 1999). Los LPSs se clasifican como lisos, semirugosos y rugosos dependiendo de la presencia del antígeno O, el núcleo externo y el núcleo interno. Los LPSs lisos poseen el antígeno O y el núcleo completos; los semirugosos son aquellos que contienen una parte del antígeno O y el núcleo completo; los rugosos solamente poseen núcleo completo (Figura 2). Hasta hace poco se pensaba que en las bacterias Gram negativas el lípido A era altamente conservado y estaba conformado por un disacárido de glucosamina fosforilado que presentaba 6 acilaciones con ácidos grasos de cadena larga (Rietschel et al. 1994). Sólo hasta que se cultivaron *in vitro* diferentes especies de *P. gingivalis*, y se mejoraron los procesos de purificación y análisis de LPSs se identificaron diferencias estructurales y de composición en los lípidos A aislados de ésta bacteria (Dixon and Darveau 2005)

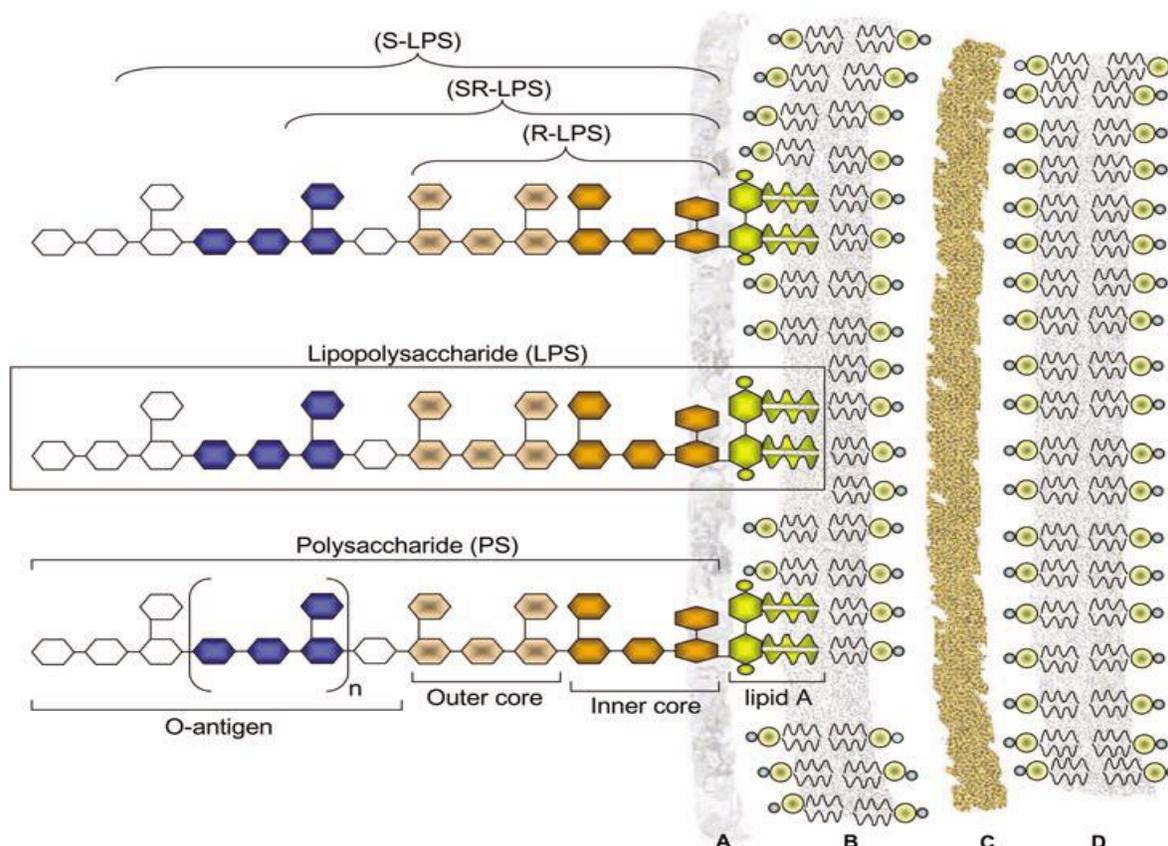


Figura 2. Representación esquemática de lipopolisacáridos sobre membranas externas de microorganismos Gram-negativos. Tomado de (Dixon and Darveau 2005)

La heterogeneidad estructural del lípido A de los LPSs aislados de *P. gingivalis*, influye en su mecanismo de reconocimiento celular y en la respuesta inflamatorias que induce. Sin embargo, miembros de la comunidad científica aducen que los contaminantes lipoproteicos de los LPSs purificados de *P. gingivalis* y no el LPS, son responsables de estas variaciones (Hirschfeld et al. 2000). Mientras LPSs de otras especies bacterianas, incluida *A. actinomycetemcomitans*, con estructuras clásicas tienen lípidos A hexa-acilados que son reconocidos por receptores TLR-4 de células epiteliales y del sistema inmune, en los LPSs de *P. gingivalis* se han identificado lípidos A penta, tetra y tri-aciladas. Se ha propuesto que estos son reconocidos por receptores diferentes al TLR-4 y que la respuesta inmune innata es diferente a la inducida por LPSs con estructura clásica. Los datos obtenidos demuestran que algunos LPSs de *P. gingivalis* son antagonistas de receptores TLR-4 y agonistas de receptores TLR-2, lo que conduce a una respuesta celular diferente (Reife et al. 2006; Herath et al. 2013; Slocum et al. 2014). Sin embargo, evidencia reciente demuestra que a pesar de la

heterogeneidad del lípido A en *P. gingivalis*, estructuras tetra-aciladas ultra purificadas son reconocidas por TLR-4 en lugar de TLR-2 (Nativel et al. 2017). Estos autores también demostraron que aunque los LPSs de *P. gingivalis* utilizan receptores TLR-4, la respuesta inflamatoria que inducen es diferente en células de ratón y en células humanas. Por esta razón, advierten de las diferencias que pueden encontrarse entre cultivos de células no humanas y humanas y sobre las consecuencias de extrapolar resultados obtenidos en células no humanas al estudio de procesos de patogenia humana.

Puede pensarse que si los LPSs de *P. gingivalis* son reconocidos por receptores TLR-4 de células del hospedero, las respuestas inflamatorias que inducen son similares a las inducidas por el lípido A clásico del LPS de *E. coli*. Sin embargo, estudios *in vivo* han mostrado que la respuesta inflamatoria inducida por los LPSs de *P. gingivalis* es más leve que la respuesta inducida por el LPS de *E. coli* (Pulendran et al. 2001). También, que los LPSs de *P. gingivalis* induce diferencias en el perfil de secreción de algunos marcadores inflamatorios en células humanas endoteliales de vena umbilical (HUVEC) y en células epiteliales orales (L Kocgozlu et al. 2009). Trabajos realizados con cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y de células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC), indican que en cada una de estas células los LPSs de *P. gingivalis* y de otras bacterias Gram negativas son reconocidos por distintos TLRs, induciendo respuestas celulares diferentes (Erridge et al. 2007). Los estudios descritos sugieren que debido a las diferencias en las respuestas inflamatorias observadas en los diferentes tipos celulares expuestos a LPSs de *P. gingivalis*, la patogenia aterosclerótica inducida por periodontopatógenos debe ser valorada con células de origen primario aisladas de los tejidos donde ocurre la patología. Por esta razón, las células endoteliales de arteria coronaria humana permiten aproximarse al contexto celular.

A pesar de que la prevalencia de *P. gingivales* en lesiones ateroscleróticas reportada es elevada (Mahalakshmi et al. 2017), en cultivos de HCAEC expuestos a LPSs de *P. gingivalis* la expresión de marcadores de la respuesta inflamatoria ha sido baja (Honda et al. 2005). En este contexto, es importante considerar que la baja respuesta inducida por *P. gingivalis* en células endoteliales puede deberse a que el modelo celular *in vitro* refleja de manera limitada

aspectos complejos de la patogenia inducida en el endotelio vascular por esta bacteria y sus factores de virulencia (e.g. la inflamación es un mecanismo del sistema inmune innato). Sin embargo, en cultivos celulares expuestos a la cepa W83 de *P. gingivalis* -de la cual se aisló uno de los LPSs evaluados en esta tesis- se encontró que esta bacteria secreta enzimas que inactivan citoquinas proinflamatorias (IL-1 β) sintetizados por células dendríticas y linfocitos T (Abdi et al. 2017). Estos resultados sugieren que un probable mecanismo de evasión empleado por esta cepa es inactivar la respuesta inmune. En este contexto, factores de virulencia como el LPS podrían tener características estructurales que contribuyeran a inactivar la expresión de marcadores inflamatorios en células endoteliales. Desafortunadamente, hacen falta estudios que describan la respuesta a periodontopatógenos de células endoteliales de arteria coronaria humana.

Debido a que los estudios llevados a cabo en modelos animales no han proporcionado datos que indiquen el papel que tienen las bacterias periodontopatógenas en el inicio de la lesión aterosclerótica, el uso de modelos basados en cultivos celulares se ha convertido en una alternativa viable para estudiar las interacciones iniciales de estas bacterias con el endotelio y el efecto de las mismas en la expresión de marcadores de función endotelial.

2.5 Características de los Cultivos Celulares

Desde hace más de 100 años los cultivos de células *in vitro* han sido desarrollados bajo condiciones fisicoquímicas y nutricionales controladas (Carrel and Burrows 1911). El crecimiento de células a lo largo y ancho de un frasco o plato de cultivo, se conoce como cultivo bidimensional (2D). El entendimiento de procesos celulares como proliferación, diferenciación, sobrevivencia, apoptosis, cáncer, respuesta inflamatoria, procesos infecciosos, terapéutica, interacciones farmacológicas, entre otros, ha sido posible gracias al empleo de cultivos celulares 2D. Resultados provenientes de este tipo de modelos han ayudado a comprender principios básicos de biología celular, inmunología, microbiología, parasitología, etc., que se han trasladado de manera exitosa a la práctica clínica para mejorar la salud de personas y animales.

Cuando condrocitos primarios aislados de cartílago de pollo, fueron sembrados sobre sustratos sintéticos rígidos -como el poliestireno- perdieron su fenotipo original y no preservaron la organización histológica original (Mayne et al. 1976; von der Mark et al. 1977). De hecho, ya han sido revisados los cambios en adhesión, proliferación, morfología, geometría, polaridad, volumen de superficie celular, tensión del citoesqueleto y función que presentan varios tipos de células (Baker and Chen 2012). Por ejemplo, las células epiteliales primarias sembradas en frascos de cultivo con superficies rígidas exhiben morfología plana y extendida debido a que se ve forzada a interactuar con el sustrato rígido, lo cual genera una alta tensión mecánica que modifica su forma (Kular et al. 2014).

Es posible que las células endoteliales cultivadas en 2D, además de estar expuestas homogéneamente a los factores solubles que ellas secretan -sin que ocurra un efecto de gradiente de concentración como sucede *in vivo*- puedan sufrir un proceso parecido al descrito para otros tipos celulares. Sin embargo, debe anotarse que la mayoría de evaluaciones de la respuesta celular inflamatoria pro-aterosclerótica inducida por microorganismos orales periodontopatógenos han sido realizadas en estos modelos.

2.6 Modelos Celulares In Vitro Empleados Para Estudiar Disfunción Endotelial Inducida por Bacterias Orales Patógenas

Los estudios *in vitro* que proporcionan evidencia experimental de los mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia utilizados por las bacterias patógenas periodontales para inducir disfunción endotelial relacionada con aterosclerosis, han utilizado principalmente macrófagos, monocitos, células endoteliales aisladas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y células endoteliales de arteria humana (HAEC).

2.6.1 Modelos Basados en Monocitos-Macrófagos.

La migración de monocitos a través del endotelio, su diferenciación a macrófago en el tejido sub-endotelial y posterior conversión a células espumosas, es un proceso característico de disfunción endotelial relacionado con aterosclerosis (Libby et al. 2013). La diferenciación de macrófagos de ratón a células espumosas ha sido observada con LPS de *A. actinomycetemcomitans* en presencia de LDL, induciendo además la expresión de citoquinas

pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6) y moléculas de adhesión (ICAM-1) (Lakio et al. 2006). La formación de células espumosas se ve afectada por el serotipo de *A. actinomycetemcomitans* de donde se aisló el LPS. Estos resultados sugieren que los LPSs de bacterias periodontopatógenos inducen la formación de células espumosas, favoreciendo la formación de placa aterosclerótica. Lipopolisacáridos de *A. actinomycetemcomitans* actúan sinérgicamente con las LDL nativas, en la formación de células espumosas (Morishita et al. 2013). El mismo resultado ha sido obtenido con *P. gingivalis* y su LPS (Lei et al. 2011; Liu et al. 2016). Lo anterior, sugiere que los LPS de bacterias periodontopatógenos inducen la formación de células espumosas, favoreciendo la formación de placa aterosclerótica.

Se han hecho esfuerzos por desarrollar modelos de cultivo celular en condiciones de flujo, que ayuden a simular las condiciones de rodamiento y adhesión de macrófagos al endotelio. Isoda y colaboradores elaboraron un sistema de micro canales cubiertos con silicona que permitió generar un flujo del medio de cultivo de 5mL/min (Isoda et al. 2009). Cada uno de estos micro canales, contaba con micro pilares que ayudaban a regular la velocidad del flujo y que proporcionaban la superficie para la adhesión de los macrófagos (RAW 264.7). En estas condiciones se demostró que los macrófagos estimulados con LPS de *A. actinomycetemcomitans* (cepa Y4) se adhieren más a los micro pilares formando estructuras similares a placas, que los macrófagos no estimulados. La formación de estas placas fue inhibida por la pre-incubación con anticuerpos anti- ICAM-1 de los macrófagos estimulados con LPS (Tsutsumi et al. 2010). Aunque una de las limitaciones del estudio fue la no inclusión de cultivos de células endoteliales, la capacidad de adhesión bajo condiciones de flujo de macrófagos estimulados con LPS de periodonto-patógenos sugiere su potencial pro-aterosclerótico.

2.6.2 Estudios en Modelos 2D de Células Endoteliales

Las monocapas de cultivos primarios de células endoteliales umbilicales, arteriales y de arteria coronaria humana (HUVEC, HAEC y HCAEC, respectivamente), también han sido usadas para establecer el papel que juegan las bacterias periodontales y sus antígenos, en la activación y disfunción del endotelio relacionada con aterosclerosis. En uno de estos modelos, se demostró que antígenos sonicados de *P. gingivalis* inducen la producción de

MCP-1 en HCAEC a través del factor de respuesta a crecimiento temprano (Egr-1), un factor de transcripción relacionado con aterosclerosis (Maekawa et al. 2010).

En células endoteliales aorticas humanas (HAEC) la interacción de LPS de *P. gingivalis* con TLR-2 activa la proteína quinasa activada por mitógenos MAPK-p38 y regula la expresión de la molécula de adhesión celular vascular VCAM-1, ambas involucradas en la respuesta inflamatoria (B. Liu et al. 2012). La cepa W83 de *P. gingivalis*, previamente evaluada en modelos animales de disfunción endotelial aterosclerótica, demostró en un estudio *in vitro* en cultivos de células HCAEC mayor capacidad de adhesión y viabilidad intracelular, e igual capacidad de invasión que la cepa *P. gingivalis* 33277 pero con moderada capacidad inflamatoria (Rodrigues et al. 2012). Esta última ha sido la cepa más evaluada en los estudios de mecanismos de patogenia con periodontopatógenos y sus factores de virulencia *in vitro* e *in vivo* (Kebuschull et al. 2010). Hasta el momento, no se conoce las respuestas relacionadas con disfunción endotelial inducida por el LPS de la cepa W83. Por su virulencia, podría esperarse una respuesta endotelial diferente a la observada con otras cepas de *P. gingivalis*.

La expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales es importante dentro del modelo de disfunción endotelial. Monocapas HUVEC estimuladas con adhesinas de *Fusobacterium nucleatum* inducen la adhesión bacteriana mediada por VE-cadherinas y el aumento de la permeabilidad endotelial, lo que permite el paso de bacterias (Fardini et al. 2011). De igual modo, se ha demostrado la inducción de apoptosis de HUVEC expuestas a *P. gingivalis* y su LPS (Bugueno et al. 2016). Células HCAEC estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* muertas por calor o su LPS inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-8). Contrariamente, la adición de rosuvastatina inhibe la expresión de las citoquinas mencionadas por un mecanismo mediado por el factor atero-protector Krüppel-like factor 2 (KLF-2) (Gualtero et al. 2017).

Ha sido descrito que la expresión de marcadores inflamatorios inducida por *P. gingivalis*, depende del tipo celular empleado en el estudio (L. Kocgozlu et al. 2009). Particularmente, en cultivos de HUVEC y HCAEC estimulados con LPS hay diferencias en los mecanismos de activación y respuesta inducida. Los autores sugieren que estas diferencias obedecen a

que las HCAEC expresan TLR-2, mientras que las HUVEC no lo expresan (Erridge et al. 2007). Contrariamente, en otro estudio se demostró que las HUVEC expresan TLR-2 al ser estimuladas con LPS de *P. gingivalis* cuando se cultivan en condiciones de fluido (Nakamura et al. 2008). Por lo anterior, las diferencias en la respuesta celular al LPS dependen de las condiciones empleadas para el cultivo celular.

2.6.3 Estudios en Modelos de Interacción Monocito-Célula Endotelial

Con el fin de estudiar la adhesión y migración de monocitos a través del endotelio, otro de los eventos relacionados con disfunción endotelial, se han evaluado las interacciones entre monocitos y células endoteliales usando modelos *in vitro*. Debido a que el proceso de rodamiento y adhesión de monocitos al endotelio ocurre en condiciones de flujo sanguíneo, monocapas de HUVEC han sido mantenidas en condiciones de flujo del medio de cultivo. Monocitos se hicieron circular durante 15 m a un flujo constante de 1 dina/cm², que simula el estrés producido en la pared basal por el flujo cortante de la sangre, sobre monocapas endoteliales previamente estimuladas con LPS de *P. gingivalis* (Nakamura et al. 2008). Se encontró que los monocitos se adherían a las monocapas estimuladas con LPS. La adhesión de monocitos a células endoteliales esta mediada por la expresión de moléculas de adhesión cuya expresión es activada por la interacción entre el receptor TLR-2 y LPS. La neutralización de TLR-2 con anticuerpos, disminuye la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 e impide la adhesión de monocitos a las células endoteliales estimuladas con LPS, sugiriendo que el proceso de adhesión está regulado por TLR-2. La secreción de moléculas quimioattractantes como IL-8 y MCP-1, luego del estímulo de células endoteliales con bacteria completa y fimbrias de patógenos periodontales, incrementa el proceso de unión monocito-endotelio (Hashizume et al. 2011).

En monocapas endoteliales cultivadas en la cara apical de cámaras transwell se evaluó la adhesión y migración de bacterias y monocitos. Los datos mostraron que monocitos THP-1 migran a través de las monocapas de HUVEC estimuladas con fimbrias de *P. gingivalis*. Igualmente, que el proceso es dependiente de TLR-2 y de la interacción entre el heterodímero $\beta 2$ integrina (CD11b/CD18) e ICAM-1 expresados en los monocitos y en las células endoteliales, respectivamente (Harokopakis et al. 2006).

La adhesión y migración de monocitos a través del endotelio, su diferenciación a macrófagos en el tejido sub-endotelial y posterior conversión a células espumosas es un proceso característico de la disfunción endotelial relacionado con aterosclerosis (Libby 2002). Los LPSs provenientes de diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans* (JP2, Y4, IDH781), indujeron la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6) y moléculas de adhesión (ICAM-1); así como, la diferenciación de macrófagos de ratón a células espumosas (Lakio et al. 2006). En la línea celular de macrófagos RAW 264.7, expuesta a LDL y a diferentes concentraciones de LPS aislado de *A. actinomycetemcomitans*, se valoró la formación de células espumosas microscópicamente después de teñir con aceite rojo O. Se encontró que éste proceso depende del serotipo de la cepa de la cual se aisló el LPS. De igual manera, se reportó que LPSs aislados de *A. actinomycetemcomitans* tienen un efecto sinérgico con las LDL nativas, en la formación de células espumosas (Morishita et al. 2013). Resultados similares también han sido reportados para *P. gingivalis* y sus LPSs (Qi et al. 2003; Lei et al. 2011). Lo anterior sugiere que los LPSs de bacterias periodontopatógenas inducen la formación de células espumosas, favoreciendo la formación de placa aterosclerótica. Sin embargo poca evidencia existe sobre la capacidad de LPS *A. actinomycetemcomitans* de inducir activación de células endoteliales generando la secreción de marcadores inflamatorios pro-ateroscleróticos y la adhesión de monocitos al endotelio activo.

La evidencia obtenida en estudios *in vitro* ha permitido proponer un mecanismo para explicar la manera en que las bacterias patógenas periodontales o sus factores de virulencia, inducen respuesta inflamatoria crónica del endotelio alterando su normal funcionamiento (Gualtero et al. 2018). Mientras el endotelio conserva su integridad, la célula endotelial mantiene un fenotipo anti-trombótico y anti-coagulante. Cuando ocurren bacteriemias y endotoxemias en individuos con periodontitis, se induce la secreción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión que inducen la disfunción endotelial asociada con inflamación crónica. La proteína de unión al LPS (LBP) facilita la unión del LPS a CD14 soluble (sCD14) o a CD14 de membrana (mCD14), lo que resulta en la activación de células endoteliales y linfocitos vía TLR2. Como respuesta al estímulo de patógenos periodontales,

las células endoteliales producen las moléculas pro-inflamatorias IL-8 y MCP-1 (proteína quimio-atrayente de monocito) y las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1; las cuales promueven el reclutamiento, la adhesión y trans migración al sub- endotelio de monocitos y linfocitos T. Si adicionalmente el paciente presenta altos niveles de LDL, estas lipoproteínas oxidadas (LDLox) se unen al endotelio y migran al sub- endotelio en donde inducen la diferenciación de macrófagos a células espumosas, lo que conduce a la acumulación del colesterol y potencia la formación de la placa aterosclerótica (**Figura 3**).

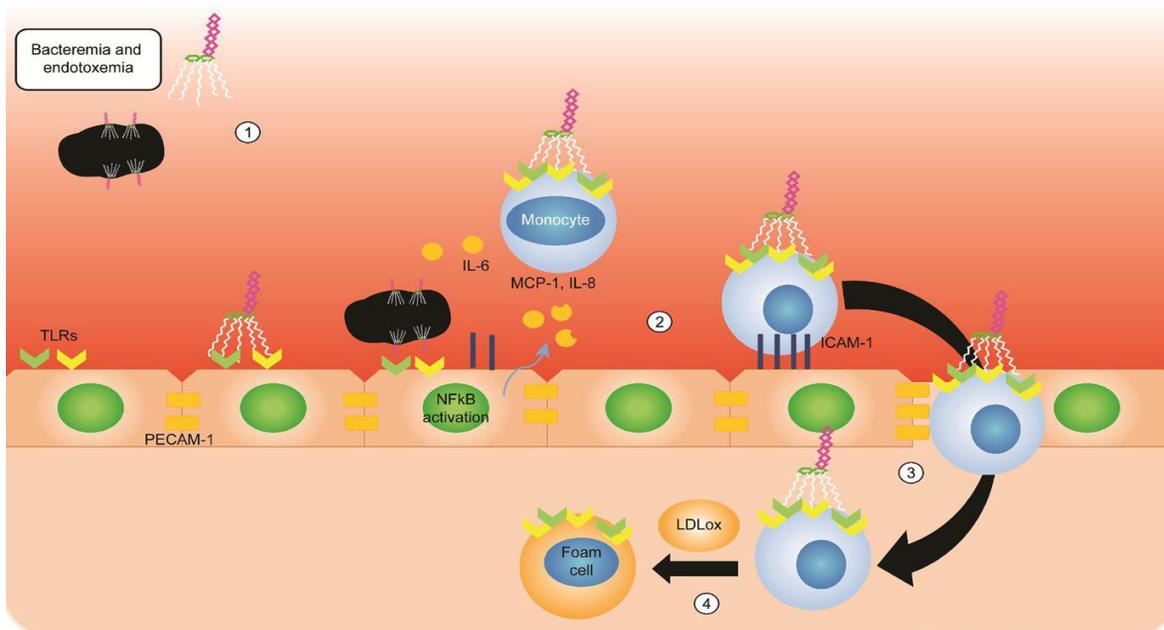


Figura 3. Mecanismos plausible de disfunción endotelial inducida por periodontopatógenos tomado de (Gualtero et al. 2018) .

2.7 Limitaciones de los Actuales Modelos Celulares In Vitro Para el Estudio de Disfunción Endotelial

A través de las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, célula-factores solubles y anclados a la matriz, las células reciben señales que al ser transducidas influyen en su comportamiento y función (Ashe and Briscoe 2006; Heino and Käpylä 2009). Las células endoteliales cultivadas sobre placas de poliestireno exhiben una polarización basal-apical inducida por el sustrato no natural sobre el que reposan, que es diferente a la que presentan *in vivo* (Indolfi et al. 2012). En consecuencia, en los cultivos 2D de células

endoteliales pueden ocurrir alteraciones en el citoesqueleto celular, en las interacciones célula-célula y en el perfil de factores solubles que secretan las células. En este contexto los cultivos 2D empleados para el estudio del potencial pro-aterosclerótico de las bacterias periodontopatógenas y sus antígenos, tienen la limitación de no reflejar las condiciones del entorno vascular sobre el que subyace el endotelio.

2.8 Cultivos Celulares Tridimensionales

Los cultivos 3D se establecen con células cultivadas en matrices o soportes tridimensionales elaborados con componentes de matriz extracelular (MEC), otros polímeros naturales (quitosano) o biomateriales artificiales (e.g.: caprolactona, copolímeros de ácido poliláctico-ácido poliglicólico (PLGA)). Proporcionan la tridimensionalidad característica de la casi totalidad de los tejidos que conforman los órganos de los seres vivos -está ausente en los cultivos 2D-. Por eso, se considera que las células se encuentran en un ambiente más parecido al del tejido *in vivo* (Duval et al. 2017). El cultivo celular tridimensional permite evaluar interacciones célula-célula y célula-matriz que influyen en el comportamiento celular (Baker and Chen 2012); así como, obtener tejido artificial *in vitro* ya que las células sembradas en los soportes se adhieren, proliferan, diferencian y sintetizan componentes de la MEC y enzimas que degradan los componentes originales de los soportes, permitiendo su recambio por tejido sintetizado *ex vivo*. En razón a lo expuesto, los cultivos 3D se han convertido en fuente de tejidos artificiales que se usan como injertos cuando el tejido disponible es escaso (James Kirkpatrick et al. 2007). También, se están usando ampliamente como modelos en el estudio de los mecanismos de patologías infecciosas y no infecciosas, evaluación de características y mecanismos de transporte de los fármacos y como sistemas de liberación controlada de fármacos y extractos y metabolitos secundarios naturales.

Al igual que la MEC de los tejidos naturales, los soportes de los cultivos tridimensionales ofrecen señales fisicoquímicas, mecánicas, estructurales y biológicas a las células que regulan muchos de sus comportamientos (e.g.: proliferación, modificación del sustrato, migración, diferenciación celular, etc.); de ahí, su creciente importancia (Griffith and Swartz 2006). Los componentes naturales más utilizados para la elaboración de soportes son

diferentes tipos de colágeno, fibrina, proteoglicanos, elastina, quitosano y mezclas de estos. La Tabla 1, describe las funciones *in vivo* y el uso *in vitro* de algunos de ellos.

Tabla 1. Algunos Componentes de Matriz Extracelular Usados para Elaborar Soportes Tridimensionales

Compuesto	Función <i>in vivo</i>	Uso <i>in vitro</i>
Colágeno tipo I fibrilar	Constituyente principal de la matriz extracelular de los tejidos conectivos. Confiere resistencia a la tensión y contribuye con la estructura tridimensional de los tejidos. Señalizador celular	Elaboración de soportes de colágeno tipo I
Colágeno tipo IV	Promueve la unión de proteínas ECM, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, Confiere estabilidad a la ECM, señalizador celular.	Elaboración de lámina basal
Fibrina	Matriz provisional formada durante la cicatrización de heridas	Elaboración de matrices
Elastina	Responsable de la elasticidad de los tejidos elásticos	Elaboración de soportes tridimensionales (principalmente con colágeno tipo I)
Proteoglicanos y glicosaminoglicanos	Resisten la compresión y obstruye el paso de macromoléculas Fija factores de crecimiento y quimoquinas	Elaboración de soportes tridimensionales (principalmente con colágeno tipo I)
Matrigel® y Geltrex®,	Extractos ricos en componentes de lámina basal como colágeno IV, laminina y heparan sulfato extraídos del tumor murino Engelbreth -Holm-Swarm.	Elaboración de geles para el cultivo tridimensional de células

Aunque la gama de biomateriales sintéticos desarrollados es extensa, muchos de ellos todavía presentan inconvenientes relacionados con su biocompatibilidad, bioactividad y biodegradación (Campillo-Fernández et al. 2009; Mateos-Timoneda et al. 2015). De ahí, que a veces se prefiera el uso de biomateriales naturales como proteínas de la familia del colágeno, entre ellas el colágeno tipo I.

El colágeno tipo I es el mayor componente de la MEC de los tejidos y hace parte de la lámina reticular de la membrana basal del endotelio (Evans et al. 2010). Cuando hace parte de soportes que solos o sembrados con células se usan *in vivo*, interactúa con el ambiente promoviendo respuestas biológicas y sin generar respuestas adversas; por esta razón, se considera biocompatible y bioactivo (Williams 2008). Existen varias formas de utilizar el colágeno en cultivos celulares. Una de ellas consiste en formar un hidrogel de colágeno fibrilar en el que se incluye la suspensión celular e incubar (37°C) la suspensión resultante, con el fin de que las células queden embebidas en el gel de colágeno. Este enfoque es normalmente utilizado en modelos celulares para el estudio de angiogénesis, migración celular en cáncer y neovascularización (DeNero et al. 2015). Sin embargo los hidrogeles basados en colágeno son débiles, difíciles de manipular y se degradan fácilmente cuando son utilizados en injertos *in vivo* como sustitutos dermales (Helary et al. 2010).

El segundo enfoque consiste en la elaboración de soportes de colágeno con mejores propiedades biomecánicas que los hidrogeles, que son más fáciles de manipular. En este método las dispersiones de colágeno son congeladas y liofilizadas, con el fin de obtener soportes porosos; los cuales, pueden ser empleados con o sin células en la regeneración de pérdidas de continuidad de la mucosa oral, piel, hueso, etc. (Espinosa et al. 2010; Helary et al. 2010; Abou Neel et al. 2013). Este tipo de soportes puede emplearse para evaluar el comportamiento de las células en estructuras tridimensionales. Por ejemplo, en nuestro grupo fibroblastos aislados de mucosa oral de conejo cultivados en soportes de este tipo hechos con colágeno tipo I, presentaron un perfil de secreción de factores solubles diferente al que mostraron en cultivos 2D (Fontanilla and Espinosa 2012). También, la morfología y perfil de secreción de factores solubles fue diferente en fibroblastos orales sembrados en soportes de colágeno I con orientación unidireccional o multidireccional de los poros (Bustos et al. 2014). Estos resultados sugieren que las características micro estructurales de los soportes tridimensionales generan señales que influyen en el comportamiento celular.

Un tercer enfoque de elaboración de soportes de colágeno tipo I, consiste en la compresión de geles de colágeno para expulsar casi el 95% de su contenido de agua de manera rápida

(1h). Con este procedimiento se han obtenido soportes 3D que incluyen fibroblastos, sobre los que se han cultivado células endoteliales (Brown et al. 2005; Alekseeva et al. 2014a). Las células endoteliales sembradas se adhirieron a la superficie del soporte, exhibieron morfología de adoquín y formaron una monocapa confluyente en la que se detectó la expresión de PECAM-1 -marcador de función endotelial de interacciones célula-célula- y proteínas de membrana basal -laminina y colágeno. Estos trabajos también demostraron que el cocultivo de las células endoteliales con fibroblastos u osteoclastos humanos, favorece la formación de estructuras capilares; lo cual, permitió generar un modelo para el estudio de mecanismos de vascularización.

Los soportes 3D también pueden ser fabricados mediante impresión de materiales bicompatibles que contienen o no células (Kreimendahl et al. 2017), electrohilado de micro y nanofibras de gelatina, elastina, polycaprolactona y poliglicaprona, etc. (X. Zhang et al. 2010). Usando soportes porosos electrohilados sembrados con células endoteliales arteriales humanas (HAEC) fue posible obtener tejido endotelial funcional luego de 7 días de cultivo. La funcionalidad del tejido fue comprobada mediante la detección de ZO-1, un marcador de uniones adherentes entre células HAEC adyacentes; la secreción de PGI₂ un marcador del fenotipo anti-trombótico del endotelio; y la baja adhesión de plaquetas al endotelio (Ibid).

Estudios publicados han reportado diferencias en el comportamiento de células cultivadas en modelos 2D y 3D en cuanto a parámetros de viabilidad, secreción de factores solubles, mecanotransducción y microentorno celular. Por ejemplo, en un estudio reciente se demostró que el origen de las células y el tipo de biomaterial usado para hacer el soporte, influyen en el comportamiento de las células en los cultivos tridimensionales. Usando hidrogeles de 5 diferentes biomateriales -colágeno, agarosa, alginato, matrigel polietilenglicol modificado con secuencias RGD- en los que se sembraron 5 tipos de células -epiteliales normales, cáncer de seno y estromales para un total de 25 cultivos tridimensionales- se demostró que los perfiles de secreción de citoquinas cambian cuando un mismo tipo de célula es sembrado en diferentes materiales y cuando en un mismo material se cultivan diferentes tipos de células (Regier et al 2017). Por lo anterior, cuando se diseña un estudio con cultivos tridimensionales se deben considerar las características del biomaterial (naturaleza química, concentración,

densidad de sitios de unión celular, rigidez, etc) y el tipo y origen de las células (línea celular vs células primarias, pasaje y densidad de siembra, etc). En la Tabla 2 se citan algunos de ellos.

Tabla 2. Diferencias en el comportamiento celular entre modelos 2D y 3D

Características	Modelo 2D	Modelo 3D	Referencia
Viabilidad	Menor susceptibilidad a agentes tóxicos estresantes (H ₂ O ₂ , AgNO ₃)	Mayor resistencia a agentes estresantes y mejor respuesta fisiológica	(Sun et al. 2006)
Secreción de proteínas	Menor secreción de Hsp70 y mayor de IL-6 del cultivo tratado con choque térmico	Secreción de Hsp70 e IL-6 opuesta a la observada en el modelo 2D.	(Kadowaki et al. 2010)
Activación intracelular	Mayor activación de NFkB frente al estímulo de TNF- α	Menor activación de NFkB y mayor sensibilidad a elevadas concentraciones de TNF- α	(Htwe et al. 2015)
Mecanotraducción	Cultivos estáticos no fluidos y sin interacciones célula-matriz extracelular	Tejidos vasculares 3D in vitro en condiciones de fluido que reflejan fuerzas mecánicas soportadas por las células in vivo	(Kutys and Chen 2016)
Microentornos	Ausencia de microentornos, rigidez del sustrato de poliestireno y comportamiento celular diferente al de la célula en los tejidos	Microentornos cambiantes que propician interacciones (adhesión, proliferación, diferenciación, interacciones célula-célula y migración) similares a las encontradas por las células en los tejidos.	(Baker and Chen 2012)

La MEC está constituida por proteínas glicosiladas (e.g.: elastina, fibronectina, laminina, proteínas de la familia del colágeno, etc), glicosaminoglicanos (dermatan sulfato, heparin-heparan sulfato, hyaluronato, etc), proteoglicanos (fibromodulina, decorina, etc.), factores de crecimiento, metaloproteinasas (MMPs), agua, iones, etc. Es secretada por las células que contiene y recambiada por proteinasas sintetizadas por éstas (Kular et al. 2014). La matriz extracelular orchestra las funciones celulares y la homeostásis de los tejidos que conforma a través de funciones diversas, entre ellas:

1. Proporcionar sitios de adhesión a las células que conforman el tejido.
2. Amortiguar las fuerzas de compresión horizontal y vertical que tensionan los tejidos.
3. Regular la migración celular.
4. Servir como reservorio de factores de crecimiento y quimoquinas.
5. Ser co-receptor para ligandos de baja afinidad.
6. Favorecer los contactos célula-célula.
7. Regular la morfología y el comportamiento celular

Los modelos *in vitro* basados en cultivos tridimensionales (3D) de células endoteliales sobre componentes de matriz extracelular, permiten que éstas interactúen con superficies más parecidas a las que subyacen al endotelio. Se ha demostrado que células HUVEC sembradas sobre una matriz de colágeno I secretan colágeno IV y laminina (Alekseeva et al. 2014a). Aunque son cultivos estáticos que no consideran las tensiones causadas en el endotelio por el torrente sanguíneo, este tipo de cultivos arroja resultados diferentes a los que proporcionan los cultivos 2D (Kutys and Chen 2016).

Como se mencionó, también se usan células endoteliales embebidas en matrices de colágeno I obtenidas por deshidratación del hidrogel que las contiene. De hecho, la mayoría de modelos 3D empleados para el estudio de las células endoteliales han utilizado este sistema (Methe and Edelman 2006; Methe et al. 2007; Methe et al. 2008; Hess et al. 2009; Indolfi et al. 2012; Murikipudi et al. 2013). Hasta donde sabemos, no se han descrito trabajos que comparen resultados provenientes de los modelos 3D en que las células endoteliales se siembran sobre la superficie de la matriz o soporte de colágeno I con los obtenidos con células endoteliales embebidas en geles de hidrolizados de colágeno I. Sin embargo, las células endoteliales embebidas en gelatina, hidrolizado soluble del colágeno, también se comportan diferente a las células cultivadas en 2D. Células HUVEC incluidas en geles 3D de colágeno hidrolizado o gelatina, al ser estimuladas con TNF- α exhiben menor adhesión de monocitos humanos THP-1 y secreción de MCP-1 que HUVEC cultivadas en 2D (Indolfi et al. 2012). En esta clase de cultivos 3D también se ha detectado la expresión de colágeno IV y proteoglicanos -componentes de la membrana basal del endotelio- y fibronectina (Murikipudi

et al. 2013), proteína que juega un papel importante durante la tubulogénesis vascular (George et al. 1997).

Estudios con células endoteliales embebidas en matrices de gelatina, han demostrado que las células embebidas retienen la capacidad secretoria exhibida por las células endoteliales quiescentes (Methe et al. 2008). También, han contribuido a entender el papel que la interacción célula-matriz tiene en el fenotipo inmune de éstas células (Alexander et al. 2009) y procesos regulatorios de la expresión y secreción de quimoquinas que participan en procesos de inflamación local y reparación de tejidos moduladas por NF-kappaB (Hess et al. 2009).

Un estudio con células endoteliales cultivadas sobre matrices de colágeno y fibrina expuestas a *Staphylococcus aureus* mostró que la secreción de MCP-1 e IL-8, la adhesión de monocitos y la actividad pro-coagulante fue significativamente menor que en las células cultivadas en 2D. Por el contrario, la secreción de factor tisular (TF) fue significativamente mayor (Heying et al. 2012). Lo descrito, sugiere que la matriz de colágeno afecta la activación pro-inflamatoria y pro-coagulante de la célula endotelial inducida por esta bacteria.

2.9. Transición Endotelial-Mesenquimal de la Célula Endotelial (TEnM)

La Transición Endotelial-Mesenquimal (TEnM) es un proceso por el cual las células endoteliales pierden progresivamente las características endoteliales y adquieren características fenotípicas de fibroblastos mesenquimales. Este proceso fue inicialmente descrito en células epiteliales que transitaban a un fenotipo mesenquimal en los tejidos en condiciones de estrés oxidativo, hipoxia o inflamación (Gonzalez and Medici 2014). Se presentan en el desarrollo de tejidos, reparación de tejidos o en enfermedades crónicas caracterizadas por tener un componente inflamatorio, como la aterosclerosis. La célula endotelial en el tejido vascular se comporta como una célula epitelial. Cuando son expuestas a estímulos inflamatorios -como LPSs- las células endoteliales presentan cambios en proliferación, migración y secreción de factores solubles (TGF- β , TNF- α , IL-6, IL-1 β) que llevan a la alteración de la función del endotelio y a la inducción de una respuesta inmune relacionada con disfunción endotelial (Choi et al. 2014). En las células que hacen esta

transición se observa disminución de la expresión de moléculas de adhesión celular, pérdida de interacciones célula-célula y disminución de la secreción de colágeno IV (Gonzalez and Medici 2014). El cambio observado en el fenotipo de las células endoteliales en condiciones inflamatorias, conduce a fibrosis endotelial y al aumento de la quimiotaxis de otras células (Pérez et al. 2017). Por esta razón, la compresión de procesos inflamatorios crónicos que conllevan a enfermedades de disfunción endotelial como la aterosclerosis involucra aspectos biológicos de la TEnM (Cho et al. 2018).

El TGF- β es otro de los estímulos que puede inducir TEnM que conduce a la dediferenciación de células endoteliales a fibroblastos. En cultivos 2D de células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) se demostró que en éste fenómeno interviene el micro RNA mir-155, regulador de la ruta de señalización celular inducida por TGF- β (Wang et al. 2017). En lesiones ateroscleróticas de ratones se han encontrado células endoteliales y fibroblastos que expresan marcadores específicos de la transición TEnM. Su presencia ha sido relacionada con la inestabilidad de la placa aterosclerótica, debido al colágeno y metaloproteinasas secretados por las TEnM (Evrard et al. 2016). El fenotipo TEnM ha sido inducido en células endoteliales primarias y endotelio de vasos sanguíneos cultivados in vitro que han sido expuestos a LPS; en estos últimos, después del tratamiento se observó fibrosis endotelial que favorece la disfunción endotelial (Echeverría et al. 2013). Poco se conoce sobre las transiciones TEnM in vitro de células endoteliales cultivadas sobre soportes tridimensionales. Sin embargo, ya fue reportado un fenotipo TEnM -similar al de células musculares lisas- en células HUVEC embebidas en geles de colágeno I hidrolizado y otros componentes de MEC (Krenning et al. 2008). Debido a que el fenotipo TEnM se origina en procesos de disfunción endotelial inducidos por mediadores inflamatorios en la aterosclerosis, se desconoce si células HCAEC cultivadas sobre soportes de colágeno tipo I y estimuladas con LPS de periodontopatógenos pueden sufrir transiciones TEnM.

2.10. Ventajas y Desventajas de los Cultivos 3D

Son varias las ventajas de estudiar el comportamiento celular en modelos 3D; sin embargo, también hay desventajas. Estas deben ser tenidas en cuenta cuando se está definiendo que tipo de modelo de cultivo celular se va a usar en estudios que involucren células primarias o

líneas celulares. A continuación, se listan algunas ventajas y desventajas de cultivos 3D realizados empleando matrices de membrana basal (Benton et al. 2009).

Ventajas:

- 1) Morfología celular y diferenciación más fisiológica que en cultivo 2D.
- 2) Posibilidad de definir rutas reguladoras en estados de diferenciación celular
- 3) Ensayos de alto rendimiento para análisis de reactivos, inhibidores, estimuladores, proteínas
- 4) Posibilidad de desarrollar tejidos artificiales que pueden ser usados como injertos en animales o humanos

Desventajas:

- 1) No todos los tipos celulares responde a matrices de membranas basales
- 2) Bajo comercio de matrices basales humanas y elevado costo
- 3) Condiciones y concentraciones óptimas de la membrana basal en el cultivo deben ser estandarizadas para cada tipo celular.

2.11 Planteamiento del Problema y Justificación

La elucidación de mecanismos de patogenia aterosclerótica inducidos por microorganismos periodontopatógenos, se ha llevado a cabo principalmente en modelos 2D constituidos por monocapas celulares formadas sobre superficies de vidrio o plástico de poliestireno, materiales que no reflejan el sustrato natural sobre el cual las células crecen en el tejido vascular. La célula endotelial crece sobre una membrana basal constituida por la lámina basal secretada por las células endoteliales, y por la lámina reticular secretada por los fibroblastos localizados en la íntima del tejido vascular. Existen modelos en los que las células endoteliales se incluyen en geles de hidrolizados de colágeno y de proteínas de matriz extracelular, producidos por células del sarcoma murino Engelbreth -Holm-Swarm. A pesar de que estos geles permiten que las células ocupen un volumen, naturalmente las células endoteliales se encuentran en la interface de la matriz subendotelial y el lumen vascular en donde están expuestas a los fluidos sanguíneo y donde se desarrolla la aterosclerosis (Ichimura and Hashimoto 1984; Peters et al. 2008; Yurdagul et al. 2016). Por ésta razón, modelos de cultivo de células endoteliales sobre matrices o soportes tridimensionales

elaborados con proteínas de la membrana basal, como el colágeno I que hace parte de la lámina reticular, pueden reflejar mejor el entorno natural de la célula endotelial. Aunque se han desarrollado modelos de esta naturaleza con células endoteliales y soportes o matrices de colágeno I, colágeno I y fibrina (Heying et al. 2012; Alekseeva et al. 2014a), en modelos tridimensionales no se ha evaluado la respuesta endotelial a LPSs de periodontopatógenos. Teniendo en cuenta la creciente evidencia de que los resultados que se obtienen con cultivos de células endoteliales 2D son diferentes a los resultados obtenidos con cultivos 3D, este trabajo desarrolló un cultivo de HCAEC sobre soportes 3D de colágeno I en el que evaluó la respuesta de éstas células a LPSs aislados de microorganismos periodontopatógenos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*). La respuesta evaluada, fue comparada con la observada en cultivos 2D con el fin de establecer si las diferencias reportadas para otros estímulos también ocurren con LPSs de periodontopatógenos.

La enfermedad periodontal se asocia con la enfermedad cardiovascular; por eso, su tratamiento reduce marcadores de riesgo de enfermedad cardiovascular. La ocurrencia de bacteriemias y endotoxemias transitorias, presencia de periodontopatógenos en lesiones ateroscleróticas en individuos con enfermedad periodontal y de elevados niveles de anticuerpos contra estas bacterias, sugieren una asociación entre estas patologías. Aunque los modelos en animales han sugerido esta relación, en el hombre no se ha podido establecer el mecanismo por el cual los periodontopatógenos originan procesos de disfunción endotelial y aterosclerosis.

El modelo más empleado en el estudio de los mecanismos de patogenia de la enfermedad cardiovascular relacionada con periodontopatógenos, es el cultivo 2D de células endoteliales sobre placas de poliestireno. Sin embargo, este enfoque experimental no incluye interacciones entre las células endoteliales y componentes de la matriz extracelular presentes en la membrana basal que las subyace *in vivo*. Ya se mencionó que en la membrana basal del tejido endotelial se encuentran tres capas: lámina lúcida, lámina densa y lámina reticular (Ichimura and Hashimoto 1984). Las dos primeras forman la lámina basal y están conformadas principalmente por lamininas, distroglicanos extracelulares, colágenos XVII y IV -**lámina lúcida**- y colágeno IV, nidógeno y proteoglicanos, entre ellos perlecan -**lámina**

densa-, moléculas que son sintetizadas por las células endoteliales. La lámina reticular contiene colágenos -I, III y V- y proteoglicanos, sintetizados por células mesenquimales como SMC y fibroblastos (Evans et al. 2010). En razón a lo expuesto, en éste trabajo se elaboró un soporte de colágeno I sobre el que se sembraron HCAECs para proporcionarles basalmente un entorno más natural que las superficies de poliestireno en las que se hacen los cultivos 2D. El modelo desarrollado se usó para evaluar diferencias en la expresión de marcadores de función endotelial e inflamación inducidos por LPS de bacterias periodontopatógenas. Igualmente, para comparar esta respuesta con la obtenida en cultivos 2D de HCAEC. La novedad del proyecto radica en que, en la literatura revisada hasta el momento, no se ha encontrado el uso de un modelo celular *in vitro* 3D con soportes de colágeno I, fibrilar, que permita conocer la respuesta de la célula endotelial ante estímulos de periodontopatógenos y evaluar marcadores de función endotelial.

2.12 Hipótesis

Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCEAC) cultivadas tridimensionalmente sobre soportes de colágeno I exhiben diferencias a nivel basal en la transcripción de genes y el perfil de factores solubles, comparado con las células cultivadas bidimensionalmente sobre placas de poliestireno y frente al estímulo con LPS de periodontopatógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar las diferencias en la expresión de algunos marcadores de inflamación y función endotelial en células endoteliales cultivadas en soportes de colágeno y en monocapa frente al estímulo por LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar y caracterizar un modelo de cultivo 3D de HCAEC sobre soportes de colágeno I.
2. Comparar la respuesta entre el modelo 3D y 2D (sin soporte) estimulado con LPS de periodontopatógenos en la expresión de marcadores de función endotelial, secreción de citoquinas, quimoquinas, y prostanoïdes.
3. Determinar la adhesión de monocitos sobre cultivos de HCAEC en 3D y 2D previamente activados con LPS de periodontopatógenos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Elaboración de Soportes de Colágeno I

La purificación de colágeno tipo I de origen bovino fue realizado según procedimiento previamente descrito por el Grupo de Trabajo de Ingeniería de Tejidos (Espinosa et al. 2010). Para la elaboración de los soportes se utilizó colágeno en suspensión a una concentración de 5mg/ml, la cual ha sido empleada por el grupo para producir soportes tridimensionales (Suesca et al. 2017). De esta suspensión se colocaron 0,2 g en la cara apical de insertos transwell de 13,8 mm de diámetro (tamaño de poro de 3 μ m; Thincert TM, Greinerbio-one, para placas de 12 pozos) y se congeló a -20°C por 24 h o a -80°C por 24 h. Luego se liofilizó (24 h) para obtener soportes asociados a la cara apical de los insertos. Estos fueron divididos y dejados sin entrecruzar o entrecruzados con glutaraldehído (0,02%, 16 h, temperatura ambiente). Los soportes entrecruzados fueron lavados con agua destilada para remover el exceso de glutaraldehído, congelados (-20°C) y vueltos a liofilizar. Al final, se obtuvieron seis tipos de soportes: i) liofilizados después de congelar a -20°C, no entrecruzados; ii) liofilizados después de congelar a -20°C, entrecruzados; iii) liofilizados después de congelar a -80°C no entrecruzados y iv) liofilizados después de congelar a -80°C entrecruzados v) soportes congelados a -20°C-liofilizados-no entrecruzados, fueron pretratados (1 h a 37°C) con una suspensión al 10 % de componentes de la membrana basal (Geltrex; Invitrogen, USA), vi) soportes congelados a -80°C-liofilizados-no entrecruzados, con geltrex al 10%.

Los soportes de colágeno I producidos en la cara apical de los insertos, fueron observados con un estereoscopio (OLYMPUS) para evaluar la retracción de los soportes con respecto a las paredes del inserto. También, fueron analizados con microscopía electrónica de transmisión- SEM (MES FEI Cuanta 200, laboratorio de microscopia electrónica de la Universidad Nacional de Colombia). Para obtener las imágenes SEM de los soportes deshidratados se cortaron fragmentos de 10 mm de diámetro, los cuales fueron metalizados

siguiendo procedimientos descritos (Boccafoschi et al. 2005). Las imágenes obtenidas con SEM, se emplearon para analizar la microestructura de los soportes deshidratados.

4.2 Cultivo Celular

Células endoteliales de arteria coronaria humana (HCACE) (criopreservadas en pasaje 3, Lonza, USA) fueron sembradas en frascos de 25 cm² (5000 células/ cm²) e incubadas (5% CO₂, 37°C) hasta alcanzar una confluencia del 90%, con cambio de medio cada 48 h. Se usó medio basal endotelial suplementado con factor de crecimiento epidermal humano (*hEGF*), factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*), factor de crecimiento fibroblástico beta humano (*FGF-β*), factor 1 de crecimiento similar a insulina-R3 (*R3-IGF-1*), hidrocortisona, ácido ascórbico y suero fetal bovino al 5% (EGMTM-2-MV BulletKitTM; Lonza, USA). Con el fin de expandir las células, los cultivos subconfluentes fueron lavados con buffer HEPES, digeridos con tripsina-EDTA (5 min, temperatura ambiente), lavados con una solución neutralizante de tripsina (Lonza, Catálogo No. CC-5034; USA) y centrifugados. El pellet celular obtenido fue resuspendido en medio fresco, las células fueron visualizadas, contadas -con la ayuda de una tinción vital- con un microscopio de luz y sembradas (5000 células/ cm²) en frascos de 75 cm² hasta confluencia. En todos los experimentos de este trabajo se utilizaron HCAEC en pase 7.

La línea celular de monocitos humano *THP-1* ATCC (American Type Culture Collection) fue sembrado en frascos T25, en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (Lonza, USA) e incubado (5% CO₂, 37°C).

4.3 Cultivos Tridimensionales (3D) de Células Endoteliales

En los seis tipos de soportes formados en la cara apical de los insertos se sembraron 2x10⁵ HCAEC/por inserto. Los cultivos establecidos fueron denominados dependiendo del soporte, de la siguiente forma: HCAEC en soportes obtenidos por congelamiento a -20°C o a -80°C y entrecruzados con glutaraldehído (3DGluCE-20 y 3DGluCE-80); HCAEC en soportes de colágeno obtenidos a -20°C y -80°C, no entrecruzados (3DCE-20 y 3DCE-80); HCAEC en soportes de colágeno obtenidos a -20°C y -80°C, no entrecruzados con Geltrex (3DGCE-20

y 3DGCE-80). Los cultivos fueron mantenidos con medio basal endotelial suplementado con factores de crecimiento, para el mantenimiento del fenotipo endotelial (EGM™-2-MV BulletKit™; Lonza, USA). El medio de cultivo fue remplazado cada 48 h, tanto en la cámara basal como en la cámara apical del inserto transwell. A los 7 días de cultivo se recolectó el sobrenadante a partir de ambos lados del transwell para evaluar la secreción de citoquinas inflamatorias. La caracterización de los diferentes cultivos fue realizado por microscopía como se describe a continuación.

4.4 Análisis Morfológico de Celulas Endoteliales Cultivadas Sobre Soportes de Colágeno

Células HCAEC cultivadas en los diferentes soportes durante 7 días, fueron fijadas con paraformaldehído (4 %) por 1 h, lavadas con PBS (buffer de sales de fosfato, pH 7,2) y teñidas con Hemalum de Mayer por 1 h para visualizar la adhesión celular. También se valoró la formación de monocapa de las HCAEC sobre los soportes de colágeno. Con tal fin, el conjunto soporte-inserto fue retirado del marco de poliestireno con un bisturí, embebido en parafina, cortado transversalmente en pequeños bloques (1 mm), y teñido con hematoxilina & eosina. Las observaciones se hicieron con un objetivo 20X en microscopio de luz (Axio imager; Zeiss, Germany). Las imágenes fueron adquiridas utilizando una cámara digital (Axiocam; Zeiss, Germany).

Para visualizar los núcleos celulares, los cultivos fueron teñidos con DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, Amsbio) durante 5 min a temperatura ambiente y lavados 2 veces con PBS. Las observaciones se hicieron al microscopio con un objetivo de 20X con filtros de fluorescencia para DAPI (Axio imager; Zeiss, Germany). La distribución de las HCAEC sobre los soportes de colágeno después de 7 días, fue visualizada con trazador fluorescente Vybrant™ Dil (Molecular Probes, Invitrogen) -10 µL/ mL de medio de cultivo endotelial-después de incubar (2 h, 37°C , 5 CO₂). Luego del lavado con PBS, los cultivos fueron observados al microscopio con objetivo 20X y filtros de fluorescencia para Dil (Axio imager; Zeiss, Germany).

4.5 Viabilidad Celular de los Cultivos 3D

La viabilidad de los diferentes cultivos 3D fue determinada luego de 7 días, mediante un ensayo de proliferación celular (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation; Promega, USA). El cultivo fue tratado con 200 μ L de la solución Celltiter por cada mililitro de medio de cultivo por 1 h a 37 °C. Los valores de absorbancia de las diferentes muestras fueron medidos a 490 nm (Infinite Pro200, TECAN).

4.6 Respuesta Inflamatoria de Células Endoteliales Cultivadas Sobre Soportes de Colágeno

Para determinar la secreción de factores solubles inflamatorios de células HCAEC cultivadas sobre los diferentes soportes de colágeno, se recolectó el sobrenadante obtenido a partir de ambos lados del transwell después de 7 días de cultivo en tres experimentos independientes, y se analizó el perfil de secreción de citoquinas. En cada muestra se evaluó la concentración de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-12 p70, IL-1 β , IL-10, mediante citometría de flujo utilizando el CBA human inflammatory cytokines kit (Catálogo No. 551811; Becton Dickinson, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La citometría de flujo fue realizada utilizando el equipo BD Accuri™ C6 y los datos obtenidos fueron analizados con el software Accuri™ C6 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA. USA).

4.7 Proliferación de HCAEC Sobre Soportes de Colágeno

La citocompatibilidad de los soportes de colágeno fue determinada mediante un ensayo de proliferación celular (CellTiter 96®; Promega). Células HCEAC (3×10^4) fueron sembradas sobre los soportes de colágeno y cultivadas hasta por 15 días. El cultivo fue tratado con 200 μ L de la solución Celltiter por cada mililitro de medio de cultivo por 2h a 37 °C. La proliferación fue registrada a los 1, 3, 5, 7 y 15 días de cultivo. Los valores de absorbancia de los cultivos fueron medidos a 490 nm en un multilector (Infinite Pro200, TECAN).

4.8 Determinación de Valores de Resistencia Eléctrica Trans-Endotelial del Cultivo Celular Tridimensional

Para determinar la confluencia del cultivo endotelial sobre los soportes de colágeno, se midieron los valores de Resistencia Eléctrica Trans-Endotelial (TEER) posterior a las 24 h (1 día), 3, 5 y 7 días de haber sembrado las células HCAEC (3×10^4) sobre los soportes de

colágeno. Los valores TEER fueron determinados utilizando el equipo Millicell*ERS (Millipore, USA) y expresados como unidades ohm/cm². Se realizaron tres mediciones a partir de tres experimentos independientes en cada uno de los tiempos evaluados.

4.9 Identificación de Marcadores Endoteliales en Células HCAEC Cultivadas Sobre Soportes de Colágeno Por Microscopía de Fluorescencia

Se evaluó la formación de uniones adherentes célula-célula en los cultivos 3D. Para esto, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabilizaron con Glicina 0.2 M por 10 minutos y Triton x-100 al 0.2 % en PBS por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron bloqueadas con suero de cabra (4 %) y albúmina (1 %) en PBS durante 1 h, e incubadas (4°C, 12 h) con anticuerpos primarios anti-PECAM-1 (1:50, Santa Cruz Biotechnology), anti-VE-Cadherina (1 µg/mL, Abcam); anti-vWF humano (Becton Dickinson, Pharmingen™, USA) diluidos en solución de bloqueo. Después de la incubación, los cultivos fueron lavados con PBS e incubados (1 h) con los anticuerpos secundarios alexa fluor™ 488 goat anti-conejo-IgG o alexa fluor™ 647 goat anti-mouse-IgG1 (5 µg/mL, InvitroGen) en solución de bloqueo. También, se utilizó rhodamina falloidina (5:200, InvitroGen) en PBS al 1 % de albumina por 20 minutos y DAPI (1 gota, Abcam) para la visualización de filamentos de F-actina y núcleos respectivamente. Finalmente, las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia (Axio imager; Zeiss).

4.10 Purificación de Lipopolisacáridos de Periodontopatógenos

La cepa W83 de *P. gingivalis* y la cepa 29522 de *Aggratibacter actinomycetemcomitans* fueron seleccionadas como fuente del LPS, debido a su virulencia (Shimada et al. 2008; Rodrigues et al. 2012). *P. gingivalis* fue sembrada en agar brucella (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) enriquecido con sangre de cordero, hemina y menadiona mientras que *A. actinomycetemcomitans* fue sembrada en agar de infusión cerebro y corazón suplementado con vancomicina. Las bacterias fueron cultivadas en condiciones anaerobias por 3 (*A.a*) y 7 días (*P.g*), siguiendo protocolos estandarizados en el laboratorio de microbiología oral de la Universidad El Bosque. La purificación del LPS se realizó una vez se comprobó la pureza de la bacteria. Las bacterias se conservaron a -80°C hasta la purificación del LPS.

La extracción de los lipopolisacáridos se realizó con fenol acuoso a partir de bacteria completa y su procedimiento de purificación consistió en un tratamiento enzimático del extracto crudo con proteasas, RNAsas y DNAasas, seguido por diálisis de las muestras. La recuperación del extracto purificado de LPS se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño, en la que las fracciones que con absorbancia de 200 nm fueron agrupadas y liofilizadas. Las fracciones obtenidas en la cromatografía fueron mezcladas con trietilamina 0,2%, deoxicolato de sodio al 0,5% y fenol saturado y centrifugadas para obtener la fase acuosa. Con el fin de obtener mayor cantidad de fase acuosa, se realizaron dos extracciones más con fenol saturado (Hirschfeld M et al., 2000). A la fase acuosa se le adicionaron etanol (75 %) y acetato de sodio (30 mM), en concentración final, y se incubó a -20 °C por 1 h. Luego se centrifugó (10000 g x 10 min a 4°C), se descartó la fase etanólica y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 3 días. Finalmente se suspendió en agua USP y se liofilizó durante 10 h. Los extractos purificados fueron caracterizados bioquímicamente por electroforesis SDS-PAGE para determinar el quimiotipo del LPS purificado. Las especificaciones del anterior protocolo de extracción, purificación y caracterización de LPS de periodontopatógenos fueron publicadas durante el desarrollo de esta tesis (Gualtero Escobar et al. 2014).

4.11 Estimulación de Cultivos 3D de Células HCAEC con LPS de Periodontopatógenos.

Soportes de colágeno I (5mg/mL) no entrecruzados, obtenidos sobre la cara apical de insertos transwell de 12 mm de diámetro, 3 µm diámetro de poro (Thincert™, Greiner Bio-one) fueron sembrados con 2×10^5 HCAEC/inserto e incubados durante 7 días para obtener el cultivo tridimensional de células endoteliales (3DCE). El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 h. Paralelamente, células endoteliales (2×10^5 células/pozo) fueron cultivadas directamente sobre placas de poliestireno (12 pozos) hasta alcanzar confluencia, para obtener las monocapas bidimensionales de HCAEC (cultivos bidimensionales-2DCE). Los cultivos 3DCE y 2DCE fueron estimulados con 1 µg/mL de LPS-P.g W83 o LPS-A.a por 24 h a 37 °C. La concentración del LPS y el tiempo de estímulo valorados durante este estudio fueron establecidos teniendo en cuenta estudios previos que evaluaron respuesta inflamatoria en células endoteliales humanas (L Kocgozlu et al. 2009; Gualtero et al. 2017). En este estudio se incluyó el LPS-A.a (Serotipo b, ATCC 29522), debido a que es un

reconocido periodontopatígeno asociado a periodontitis agresivas, endocarditis infecciosas y aterosclerosis (T. Zhang et al. 2010; Yew et al. 2014). En estos experimentos se incluyeron cultivos 3D y 2D no estimulados con LPSs como control. Después de la exposición a los LPSs, los sobrenadantes de los cultivos 3DCE y 2DCE fueron y almacenados a -80°C . En los cultivos 3DCE se recolectaron los medios de la cámara superior e inferior del transwell. Además se evaluó el efecto del LPS de periodontopatógenos sobre las interacciones célula-célula en el cultivo tridimensional mediante la marcación de PECAM-1 para análisis de microscopía de fluorescencia como fue reportado en la sección 4.10.

4.12 Evaluación de la Transcripción de Genes que Codifican Factores Asociados con Disfunción Endotelial

Usando qRT-PCR, se cuantificaron cambios en la transcripción de genes que codifican factores asociados con la disfunción endotelial, cuando HCAEC cultivadas en 3DCE y 2DCE se incuban con LPS-P.g o LPS-A.a. Se cuantificó la transcripción de los siguientes genes: ciclooxigenasa 2 (COX-2), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), Factor de Von Willebrand (vWF), IL8 y MCP-1 (tabla 3). El ARN proveniente de los cultivos celulares 3D y 2D expuestos o no (control) a los LPSs de interés, fue extraído con Trizol (InvitroGen, USA) y purificado con PureLink RNA kit (Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Antes de extraer el RNA de los cultivos 3DCE, estos fueron digeridos (30 minutos, 37°C) con colagenasa (3 mg/ml medio endotelial sin suero; InvitroGen) para degradar los soportes de colágeno y liberar las células adheridas al soporte. Luego de la digestión enzimática, la suspensión resultante fue centrifugada (3000 rpm x 5 min) con el propósito de aislar las células endoteliales. Un vez se aisló el ARN total de HCAEC cultivadas en 3D y 2D, su calidad y cantidad fue determinada con un NanoQuant Plate-Tecan (Infinite pro 200, TECAN). Después, se llevó a cabo la amplificación y cuantificación de los ARNm transcritos por los genes en estudio.

Tabla 3. Secuencia de primers y genes amplificados

Gen	Secuencia	Origen
COX2 Fw	5-AGGGTTGCTGGTGGTAGGAA-3	(Tan et al. 2007)
COX2 Rv	5-GGTCAATGGAAGCCTGTGATACT-3	
iNOS Fw	5-ACCAGTACGTTTGGCAATGGAGA-3	(Hama et al. 2008)
iNOS Rv	5-GAACCGAGGGTACATGCTGGA-3	
eNOS Fw	5-AGCTGTGCTGGCATAACAGGA-3	(Prasad and Krishnan 2008)
eNOS Rv	5-ATGGTAACATCGCCGCAGAC-3	
vWF Fw	5-CACCATTTCAGCTAAGAGGAGG-3	(Prasad Chennazhy and Krishnan 2005)
vWF Rv	5 -GCCCTGGCAGTAGTGGATA-3	
IL8 Fw	5-TGTGAAGGTGCAGTTTTGCCAAGG-3	(Diseñados, primer 3)
IL8 Rv	5- GTTGGCGCAGTGTGGTCCACTC- 3	
MCP-1 Fw	5-GAAAGTCTCTGCCGCCCTT-3	(Diseñado, primer 3)
MCP-1 Rv	5-TTGATTGCATCTGGCTGAGCG-3	
GAPDH Fw	5- GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA-3	(Diseñados, Grupo de Virología, UEB)
GAPDH Rv	5- GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3	

La amplificación se hizo en un solo paso usando una mezcla de reacción que contenía buffer, dNTPs, enzimas -retrotranscriptasa y Taq DNA polimerasa (qScript 1-Step SYBR Green qRT-PCR kit; Quantabio, USA)-, cyber green y MgCl₂. El protocolo de amplificación utilizado en el equipo C1000TM (CFX96 TM Real Time System. BIO-RAD. USA), fue el siguiente: un ciclo a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 3 seg y 60°C por 30;

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/uL de ARN en 15 µL de la mezcla de reacción descrita anteriormente. 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 con respecto al control, sin estímulo, usando el método $\Delta\Delta Cq$ utilizando el software Bio-Rad CFX manager 3.1. Los primers empleados son presentados en la Tabla 3; los primers de unión a regiones inter-exónicas de los genes de IL-8 y MCP-1, fueron diseñados utilizando el programa NCBI/primer BLAST. Las secuencias de los primers relacionados con función endotelial fueron tomados de estudios previos reportados en la literatura. Cada tratamiento fue evaluado tres veces de manera independiente y las cuantificaciones reportadas en este documento, corresponden al promedio de los tres valores medidos en cada experimento.

4.13 Cuantificación de Factores Solubles en Cultivos 3DCE, 2DCE y Estimulados con LPS de Periodontopatógenos

Muestras de sobrenadantes de cultivos 2DCE y 3DCE, estimulados o no con LPS, fueron almacenadas (-80°C) y enviadas para análisis de cuantificación de proteínas inflamatorias a Raybiotech (USA). El análisis fue llevado a cabo con el sistema Quantibody Human inflammation Array -3 (QAH-INF-3, RayBiotech, USA), que inmunodetecta y cuantifica 40 citoquinas. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado, usando una curva de calibración elaborada con estándares de concentración conocida.

4.14 Ensayo de Adhesión de Monocitos THP-1 a Células HCAEC

Con el fin de establecer si en los cultivos 3D y 2D de HCAEC expuestos a LPS-P.g o LPS-A.a. aumenta la adhesión de monocitos con respecto a los cultivos control, se realizó un ensayo de adhesión célula endotelial-monocito siguiendo procedimientos descritos (Hashizume et al. 2011). Los cultivos 2D se establecieron sembrando 2×10^4 HCAEC /pozo, en cajas 96 pozos. Los cultivos 3D se establecieron sembrando 2×10^4 HCAEC en soportes localizados sobre la superficie de los pozos de cajas de 96 pozos, que fueron preparados siguiendo el procedimiento previamente descrito para su elaboración en insertos transwell. Los dos tipos de cultivos fueron incubados (5% CO₂, 37°C) hasta alcanzar confluencia (7

días), cambiando el medio cada 48 h. Luego, fueron estimulados por 24 horas con 1 µg/ml de LPS-*P.g* W83 o LPS-A.a; cultivos 2D y 3D de HCAEC no estimulados con LPS fueron usados como control. Luego del estímulo los pozos fueron lavados con medio de cultivo endotelial y los cultivos incubados (1h) con monocitos THP-1 (2×10^5 células/pozo, ATCC® TIB-202™), previamente marcados con calceína AM (10 µM, InvitroGen). Después de la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS en un lavador de placa con agitación media (Thermo Scientific). La adhesión de monocitos a las HCAEC fue medida en unidades de fluorescencia (excitación 485 nm/emisión 535 nm; TECAN, Infinite 200 PRO).

4. 15 Cuantificación de TXA₂ y PGI₂ Mediante Prueba ELISA

La actividad anti- y protombótica inducida por la exposición de cultivos 3D y 2D de células HCAEC a LPS-*P.g* o LPS-A.a. fue evaluada midiendo la secreción de tromboxano A₂ (TXA₂) - una molécula mediadora de la activación-agregación de plaquetas- y de prostanglandina I₂ (PGI₂) -una molécula inhibidora de adhesión de leucocitos y plaquetas- en sobrenadantes de cultivos 3DCE y 2DCE estimulados por 24 h con 1 µg/mL LPS-*P.g* o LPS-A.a. Para esto, se usó un kit de ELISA competitiva (Cayman Chemical, USA), que cuantifica 6-keto prostaglandin F_{1α} y TXB₂, metabolitos estables de PGI₂ y de TXA₂. Los procedimientos y análisis de datos fueron realizados siguiendo las indicaciones del fabricante. Los sobrenadantes utilizados fueron obtenidos en tres experimentos diferentes. Las mediciones con el kit se realizaron por duplicado.

4. 16 Análisis Estadístico

Se organizaron los datos que provenían de dos grupos (2DCE y 3DCE) expuestos a tres diferentes tratamientos (control, LPS-*P.g*, LPS-A.a). Cada tratamiento fue realizado al menos tres veces de manera independiente para los diferentes ensayos. La expresión de las diferentes variables fue reportada de manera cuantitativa en pico gramo por mililitro (pg/mL) para los factores solubles, o de manera relativa para la expresión de genes; y graficados como media ± *ESM* (Error estándar de la media).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para investigar las relaciones entre las citoquinas secretadas en los diferentes tratamientos y los dos modelos de cultivo celular.

La matriz de datos original incluyó los dos grupos (2DCE y 3DCE) y las concentraciones de las 40 citoquinas valoradas para cada tratamiento (Control, LPS-P.g, LPS-A.a). Para este análisis, los datos de cada variable (concentración de citoquina) fueron normalizados teniendo en cuenta el límite de detección y el valor máximo obtenido para dicha variable durante el ensayo de arreglos de citoquinas. Los valores normalizados estuvieron en el rango de 0 a 1. El análisis fue realizado utilizando el módulo de Python para aprendizaje de máquina Scikit-learn (Pedregosa et al. 2011).

Para establecer diferencias en la expresión de las variables entre los tratamientos dentro de cada grupo, o establecer diferencias en la expresión de una variable para un mismo tratamiento entre los dos grupos, los datos que siguieron una distribución normal fueron analizados por ANOVA con Post hoc de Bonferroni. A los datos que no siguieron distribución normal, se les hizo un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con el test Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1.1 Características Macro y Microscópicas de Soportes de Colágeno I en Insertos Transwell

Imágenes representativas de los soportes de colágeno que fueron elaborados sobre insertos transwell mediante siguiendo los procesos descritos en la metodología son presentadas en la **Figura 4**. Diferentes vistas de los insertos permiten observar el soporte colágeno formado, el cual al contraerse se separa de las paredes del inserto (**Figura 4A**). Al colocar los insertos con los soportes en las cajas de 12 pozos, se evidencian la cámara superior donde se encuentra el soporte de colágeno (**Figura 4B**) y la cámara inferior en donde se coloca el medio de cultivo (**Figura 4C**).



Figura 4. Diseño de soportes de colágeno I elaborados sobre Insertos Transwell. Una suspensión de 0,2 g colágeno I [5m/mL] fue depositada sobre insertos transwell de 13,8 mm de diámetro, con poros de 3 μ m, congelada y liofilizada. A) Soportes 3D en insertos Transwell; B) Vista superior, C) Sistema soporte-Insertos transwell en pozo de placa de cultivo celular.

En los primeros experimentos realizados en este trabajo, se hicieron soportes congelando la dispersión de colágeno I a dos temperaturas: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La **Figura 5** muestra la apariencia macroscópica de los soportes de colágeno I visualizada con un estereoscopio. En las imágenes de los soportes obtenidos después de congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa que éstos se contraen (**Figura 5A**); igualmente, que presentan una aparente organización esponjosa de las fibras (**Figura 5B**). En las imágenes de los soportes obtenidos después de congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, también es evidente la contracción que estos sufren después de ser liofilizados (**Figura 5C**).

Llama la atención que aparentemente las fibras se organizan con un patrón diferente al observado en los soportes que se obtuvieron congelando a -20°C (**Figura 5D**).

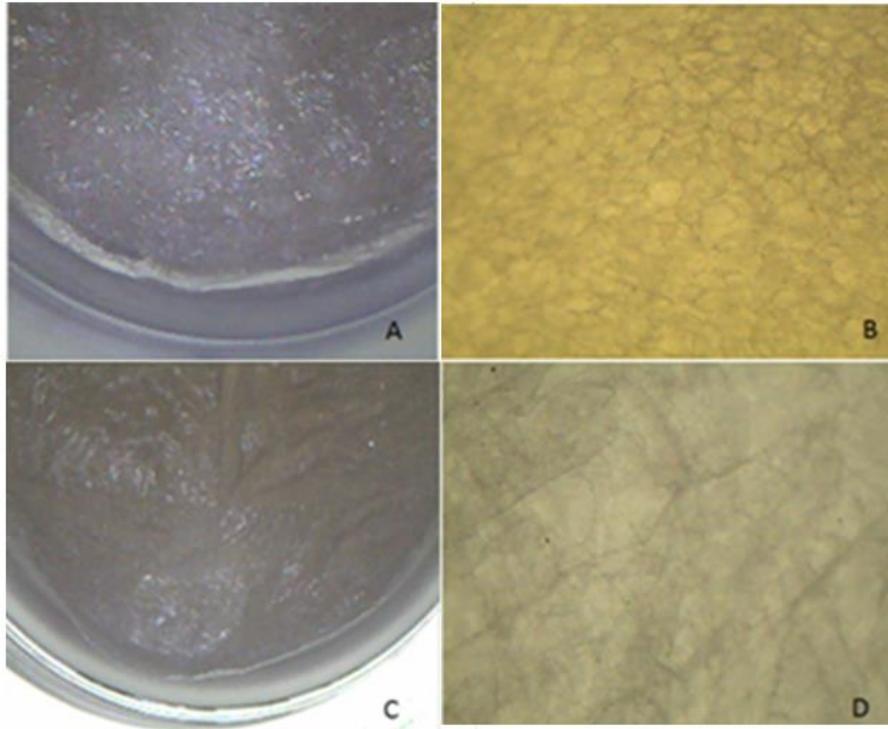


Figura 5. *Imágenes estereoscópicas de soportes de colágeno I elaborados a -20°C (A, B) y a -80°C (C, D). Las flechas indican la separación del soporte de las paredes del inserto Transwell.*

Los soportes elaborados en la cara apical de los insertos fueron analizados con SEM (**Figura 6**). En las micrografías de la superficie de los soportes obtenidos después de congelar -20°C , se observa la presencia de poros y ondulaciones irregulares (**Figura 6A**). El corte transversal de estos soportes hace más evidente la estructura porosa de los mismos (**Figura 6B**). Las micrografías de la superficie de los soportes elaborados a -80°C , muestran una superficie aparentemente menos porosa y ondulada que la de los soportes elaborados a -20°C (**Figura 6C**). La imagen correspondiente al corte transversal revela una estructura del soporte lamelar traviculada (**Figura 6D**).

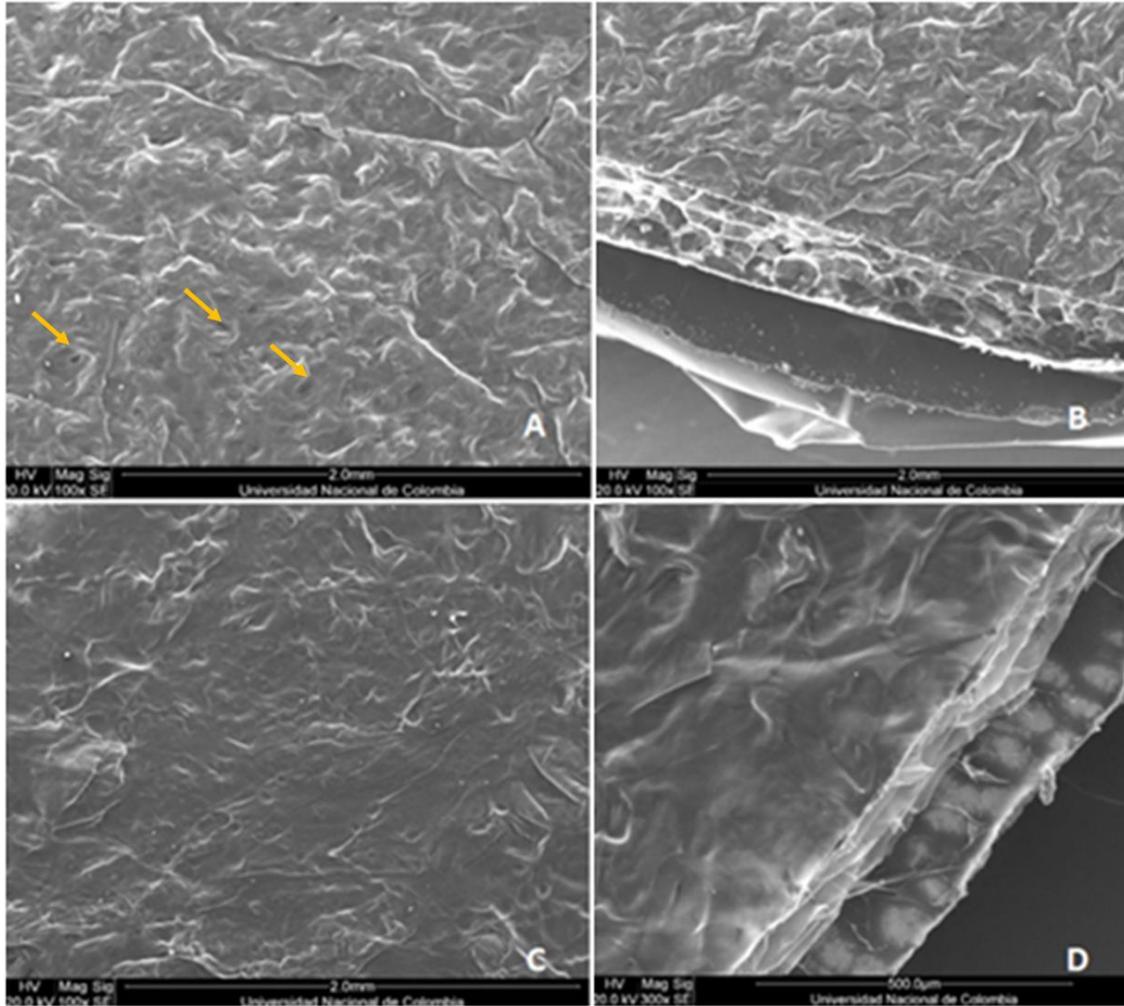


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de soportes de colágeno I (5 mg/mL) no entrecruzados. Las muestras fueron congeladas a -20°C (A y B), a -80°C (C y D) y se sometieron a liofilización. Las barras en las imágenes corresponden a una escala de 2 mm o 500 μm . Las flechas incluidas señalan poros.

5.1.2 Caracterización de Cultivos Endoteliales Tridimensionales

Como se describió en la metodología, inicialmente se elaboraron seis tipos de soportes. Su capacidad de soportar el crecimiento de células HCAEC, fue evaluada obteniendo seis tipos de cultivos 3D. La **Figura 7** contiene imágenes representativas de cada uno de los cultivos 3D incluidas en éste estudio, después de 7 días de incubación y luego de ser teñidas con Hemalum de Mayer. En todos los soportes se observa la presencia de HCAEC. En los soportes obtenidos después de congelar a las dos temperaturas y entrecruzar con glutaraldehído (3DGluCE), aparentemente la densidad celular fue menor y las células no formaron monocapa. En estos, las HCAEC se observan organizadas en grupos pequeños que

se distribuyen en todo el campo. Por otro lado, las células cultivadas en los soportes no entrecruzados (3DCE) o en los soportes tratados con geltrex (3DGCE) parecen tener mayor celularidad y formar una monocapa celular confluyente sobre el soporte.

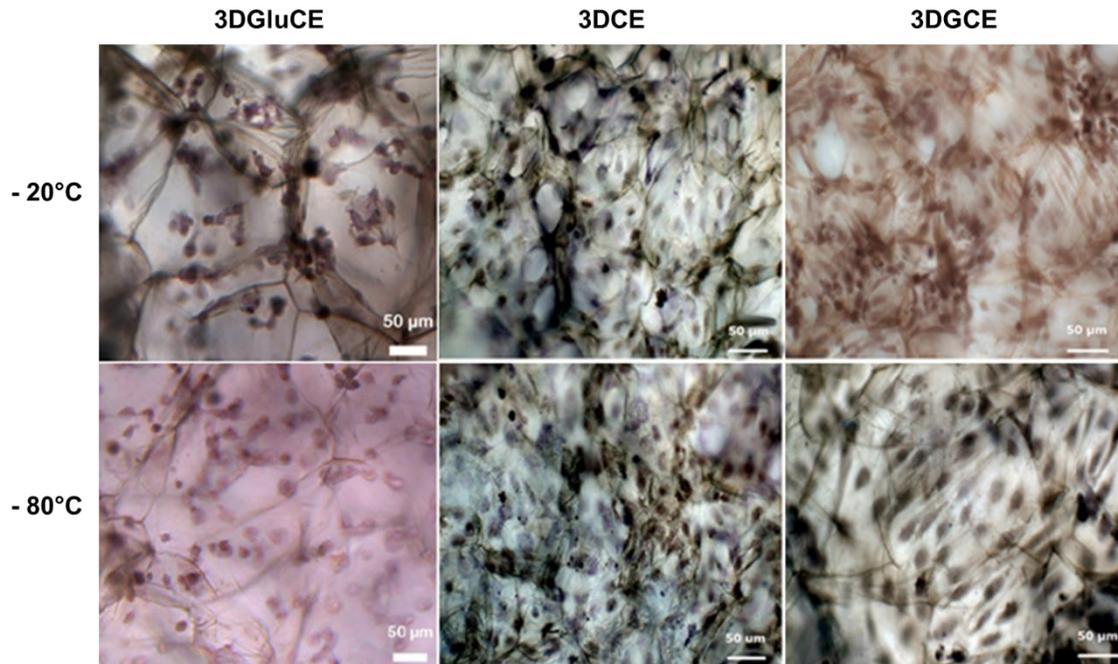


Figura 7. Microscopia de luz de cultivos 3D de células endoteliales de arteria coronaria humana. Después de incubar durante 7 días, los cultivos fueron teñidos con Hemalum de Mayer y observados al microscopio de luz. Las imágenes corresponden a una vista apical de los soportes

Los cultivos también fueron teñidos con DAPI, con el fin de evidenciar células nucleadas (**Figura 8**). En los cultivos hechos sobre los soportes entrecruzados con glutaraldehído, se observó un número menor de HCAEC nucleadas que en los cultivos hechos sobre los soportes no entrecruzados o en los soportes modificados con Geltrex. Corroborando las observaciones realizadas con el microscopio de luz.

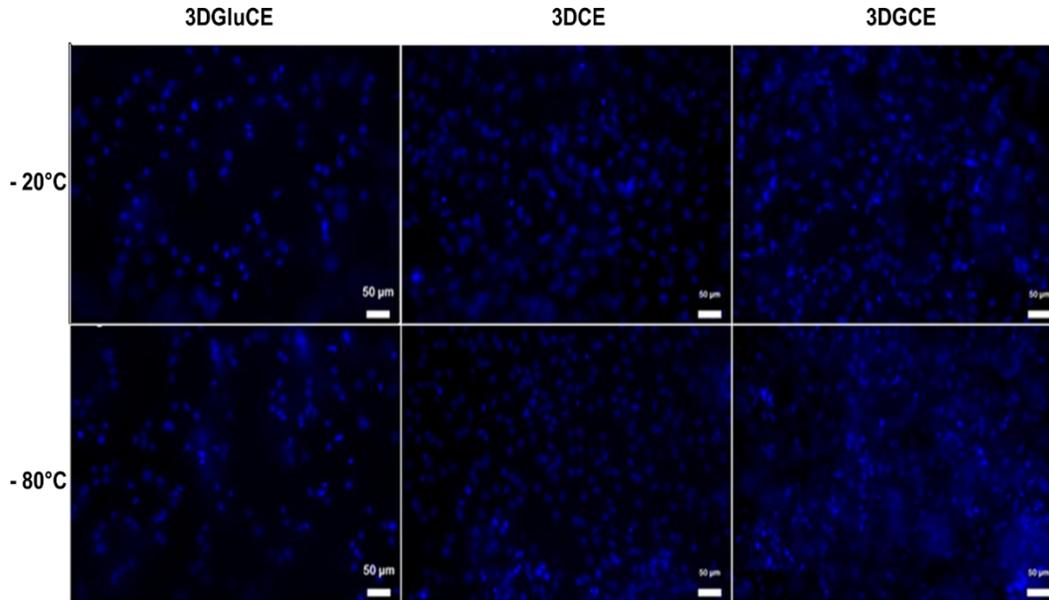


Figura 8. Microscopía de fluorescencia de cultivos 3D de células HCAEC. Después de incubar durante 7 días, los cultivos de HCAEC fueron fijados y teñidos con DAPI. La barra en las imágenes corresponde a una escala de 50 µm.

5.1.3 Evaluación de la viabilidad celular en los cultivos 3D

Los datos de viabilidad de células HCAEC cultivadas durante 7 días sobre los diferentes tipos de soportes se muestran en la **Figura 9**. A pesar de que no hubo diferencias significativas en la viabilidad celular, los cultivos 3DCE-20 y 3DCE-80 mostraron tendencia a tener mayor viabilidad que los otros cultivos (3DGCE-20, 3DGCE-80, 3DGlucose-20 y 3DGlucose-80).

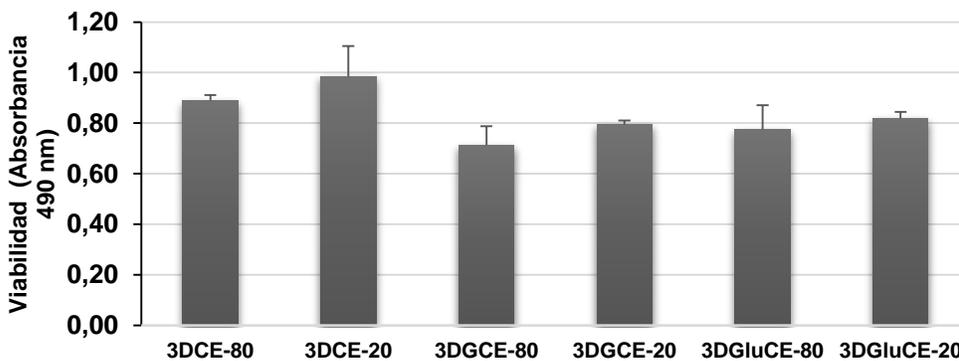


Figura 9. Viabilidad de las HCAEC en los cultivos 3D. Siglas: 3DCE-80 (HCAEC sembradas en soportes no entrecruzados y elaborados con colágeno congelado a -80°C); 3DCE-20 (HCAEC sembradas en soportes no entrecruzados y elaborados con colágeno congelado a -20°C); 3DGCE-80 (HCAEC sembradas en soportes tratados con Geltrex y elaborados con colágeno congelado a -80°C); 3DGCE-20 (HCAEC sembradas en soportes tratados con Geltrex y elaborados con colágeno congelado a -20°C); 3DGlucose-80 (HCAEC sembradas en soportes elaborados con colágeno congelado a -20°C y entrecruzados con glutaraldehído); 3DGlucose-20

(HCAEC sembradas en soportes elaborados con colágeno congelado a -20°C y entrecruzados con glutaraldehído). La gráfica representa la media y el error estándar de mediciones realizadas por triplicado.

5.1.4 Evaluación de la secreción basal de citoquinas pro-inflamatoria en los cultivos 3D

El efecto de los soportes en la expresión basal de 6 citoquinas pro-inflamatorias fue determinado, cuantificando la concentración de estas proteínas en los medios provenientes de los cultivos 3D después de 7 días de incubación (**Figura 10**). En todos los medios se detectaron y cuantificaron IL-6 e IL-8; sin embargo, en ninguno de ellos se detectó la secreción de TNF- α , IL-12 p70, IL-1 β , IL-10.

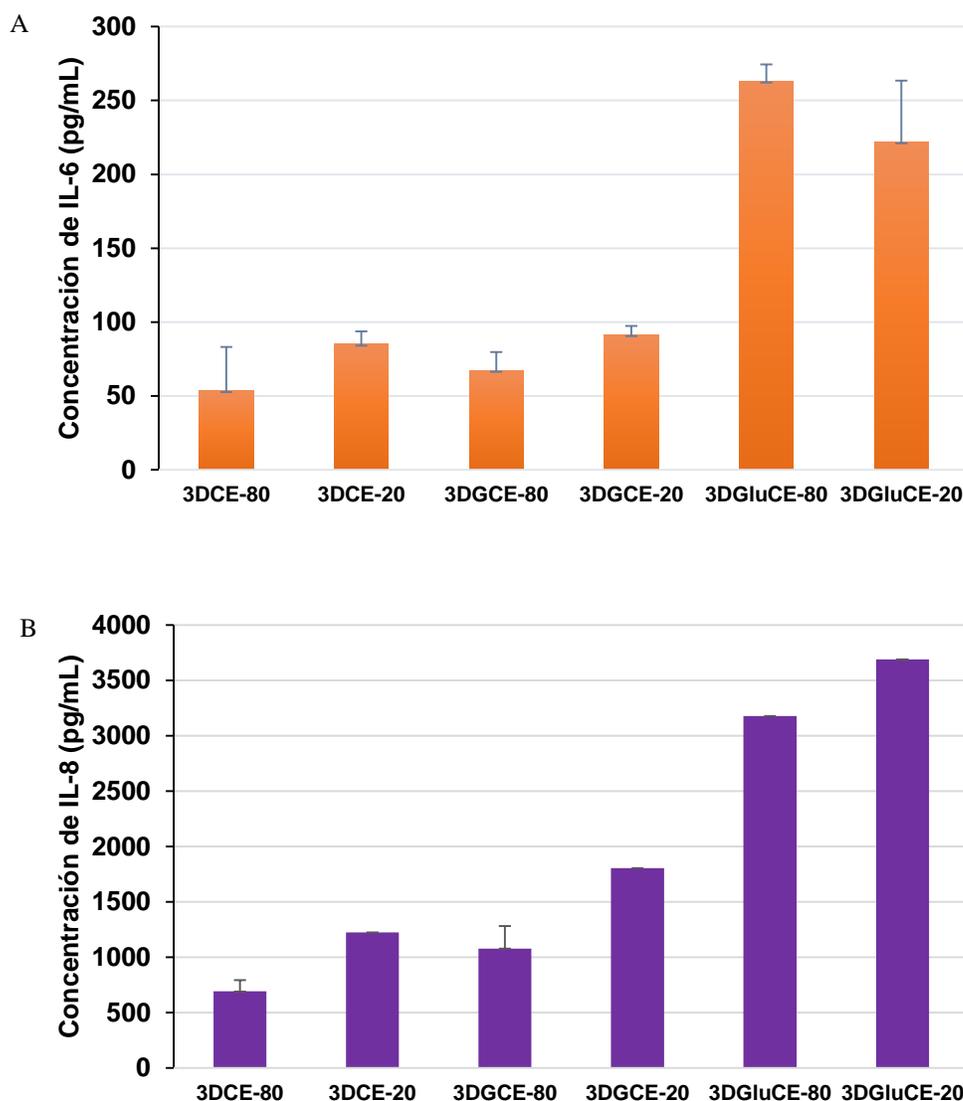


Figura 10. Concentración basal de citoquinas pro-inflamatorias en los cultivos 3D. (A) Interleuquina 6; (B) Interleuquina 8. La gráfica representa la media y la desviación estándar de mediciones realizadas por triplicado.

La menor concentración de IL-6 fue observada en los cultivos 3DCE-80 y 3DGCE-80 (53,5 pg/mL y 67,36 pg/mL, respectivamente) (**Figura 10A**). La menor concentración de IL-8 fue encontrada los cultivos 3DCE-80 y 3DGCE-80 (692 pg/mL y 1078 pg/mL, respectivamente) (**Figura 10B**). En los cultivos hechos con los soportes entrecruzados con glutaraldehído (3DGluCE-20 y 3DGluCE-80), se encontraron las mayores concentraciones basales de IL-6 e IL-8. Debido a que el propósito de desarrollar cultivos 3D de células endoteliales, era obtener un modelo para estudiar marcadores inflamatorios inducidos por LPS de periodontopatógenos más cercano a las condiciones *in vivo*, los niveles basales de IL-6 e IL-8 encontrados sirvieron para reducir los seis tipos de cultivos 3D iniciales a dos. Se escogieron los cultivos 3DCE-80 y 3DGCE-80 por inducir la expresión de los niveles basales más bajos de estas dos citoquinas, para continuar con las evaluaciones propuestas en este trabajo.

5.1.5. Análisis histológico de cultivos de células HCAEC sembradas en soportes no entrecruzados de colágeno I y Geltrex obtenidos después de congelar a -80°C .

Lo primero que se quiso evaluar en los cultivos escogidos, fue la formación de monocapa endotelial. Para esto, se hicieron tinciones histoquímicas de cortes transversales de cultivos incubados durante 7 días (**Figura 11**). Las HCAEC crecieron en los dos soportes; sin embargo, en el cultivo 3DCEG-80 se observan varias capas de células (**Figura 11A**) mientras que en el cultivo 3DCE-80, se formó una delgada monocapa sobre la cara apical del soporte de colágeno (**Figura 11B**).

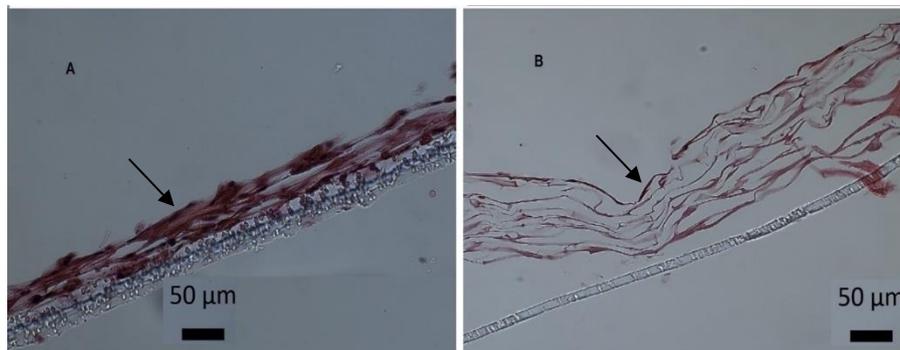


Figura 11. Análisis histoquímico de los cultivos 3D. La figura muestra imágenes de cortes transversales de los cultivos (A) 3DGCE-80 y (B) 3DCE-80, después de 7 días de cultivo. Las flechas señalan las células HCAEC cultivadas en la cara apical de los soportes. La escala se incluye en la figura.

5.1.6. Microscopía de fluorescencia de HCAEC cultivadas en 3D

La tinción lipofílica Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('DiI'; DiIC18(3)) es usada con el fin de marcar por periodos prolongados a las células. En este trabajo se utilizó para evaluar la distribución de las células sembradas en la cara apical de los soportes. La **Figura 12B** muestra una imagen representativa de los cultivos 3DCE-80, en la que se observa su distribución sobre la toda superficie del soporte. La **Figura 12A** muestra una imagen representativa de los cultivos 3DCEG-80, en la que también se observan células distribuidas en todo el soporte.

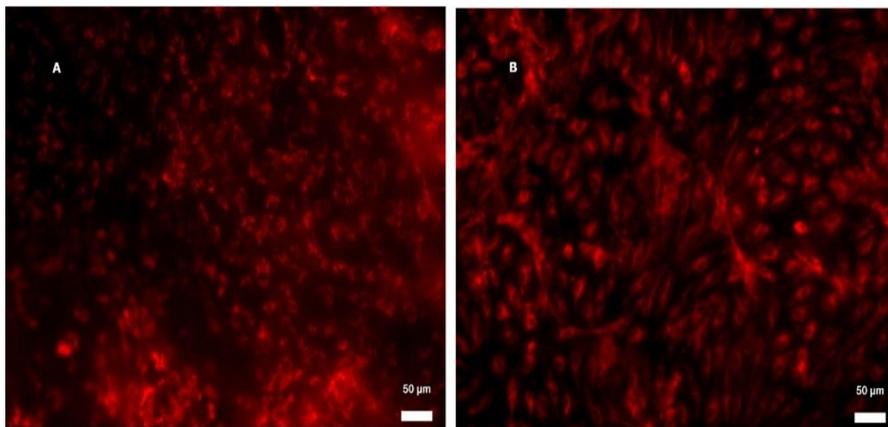


Figura 12. Análisis con microscopía de fluorescencia de la distribución celular en la superficie apical de los cultivos 3D. Células HCAEC fueron cultivadas durante 7 días y marcadas con el trazador fluorescente Dil como se describió en metodología. (A) Cultivos 3DCE-80; (B) Cultivos 3DCEG-80. La escala se incluye en la figura.

Para confirmar la presencia de interacciones célula-célula en los cultivos 3D, estos fueron marcados con anticuerpos para la identificación membranal de VE-Cadherina y PECAM-1. También, fueron teñidos con rodamina para la observación de los filamentos de F-actina del citoesqueleto y con DAPI, para la marcación de núcleos. La **Figura 13** muestra imágenes representativas de los cultivos 3DGCE obtenidas con microscopía fluorescente. Claramente se pueden observar los núcleos de las HCAEC (**Figura 13A**) y las moléculas de PECAM-1 en la membrana celular (**Figure 13B**). Con la fusión de las imágenes descritas se colocaron los núcleos y moléculas de PECAM-1, evidenciándose la formación de una monocapa de HCAEC sobre el soporte (**Figura 13C**). La colocación de PECAM-1 y los filamentos de F-actina (**Figura 13D**), confirmó la formación de uniones entre las células. En

este modelo no fue posible localizar celularmente a la VE-cadherina, debido tal vez a problemas asociados con la distribución del anticuerpo en el soporte modificado con Geltrex.

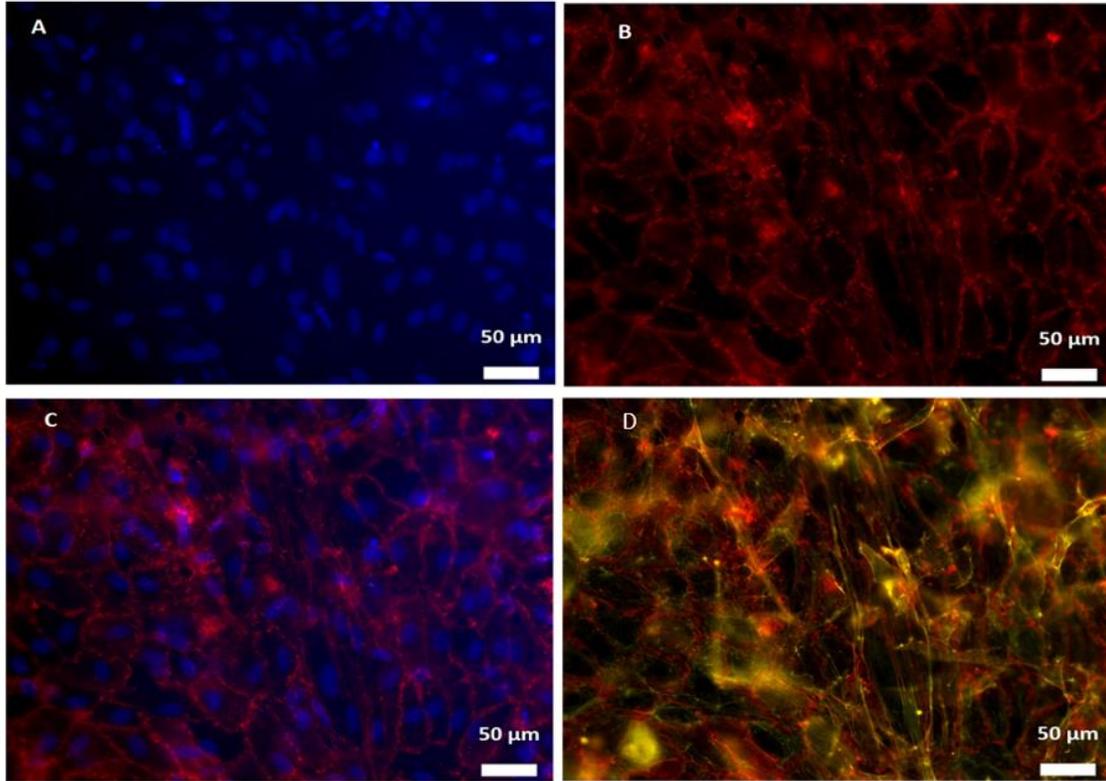


Figura 13. Observaciones con microscopía de fluorescencia de la superficie apical del cultivo 3DGCE. (A) Células teñidas con DAPI para visualización de los núcleos; (B) Células inmunoteñidas para detectar PECAM-1 en membrana celular; (C) Colocalización de núcleos teñidos con DAPI y PECAM-1 en membrana celular; (D) Colocalización de PECAM-1 y filamentos de F-actina, detectados con rodamina falloidine. Escala: la barra representa una escala de 50 µm en todas las imágenes. DAPI (azul), anti-PECAM-1 (rojo), F-actina-rodamina falloidine (amarillo).

En la **Figura 14** se observan imágenes representativas de los cultivos 3DCE. Al igual que en el modelo 3DGCE, las uniones entre las HCAEC se evidenciaron con la marcación de PECAM-1 (**Figura 14A**) y los filamentos de F-actina del citoesqueleto (**Figura 14B**). Al fusionar estas imágenes y colocalizar a PECAM-1 y F-actina en las células, fue evidente la formación de una monocapa confluyente (**Figura 14C**). La marcación de VE-cadherina - proteína que interviene en la formación de uniones estrechas- confirmó la formación de una monocapa confluyente de HCAECs en estos cultivos (**Figura 14D**).

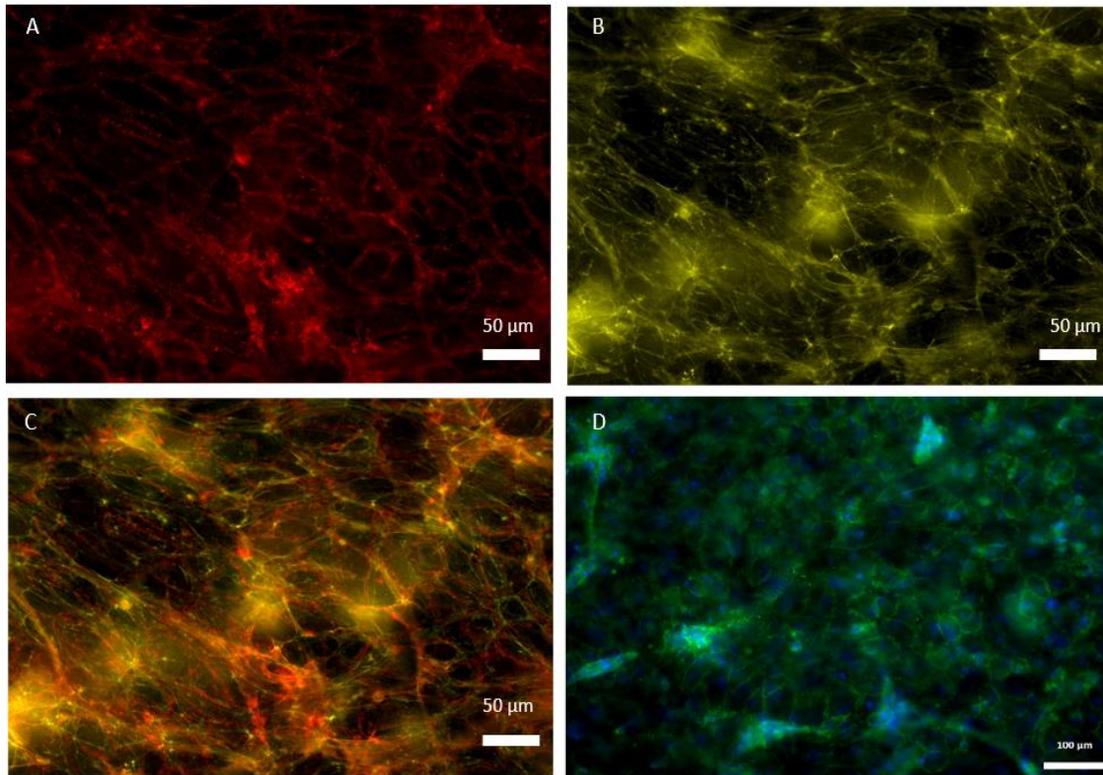


Figura 14. *Observaciones con microscopía de fluorescencia de la superficie apical del cultivo 3DCE.* (A) Células inmunoteñidas para detectar PECAM-1 en membrana celular; (B) Filamentos de F-actina; (C) Colocalización de PECAM-1 y filamentos de F-actina en membrana celular; (D) Colocalización de VE-caderina y núcleos. La barra representa una escala de 50 μm o 100 μm en las imágenes.

Uno de los intereses de éste trabajo fue comparar los resultados obtenidos con los cultivos 3D y 2D, por eso se tiñeron cultivos 2D de HCAECs sembradas en cajas de cultivo, sobre superficies de poliestireno (**Figura 15**). Se muestran imágenes fluorescentes de un cultivo 2D de HCAECs inmunoteñido con anticuerpo anti VE-caderina y con DAPI (**Figura 15A**), rodamina (**Figura 15B**) y una imagen sobrepuesta de los tres marcadores en donde se identifican VE-caderina, citoesqueleto y núcleo (**Figura 15C**). Al igual que en los cultivos 3D, los cultivos 2D formaron una monocapa confluyente de células endoteliales sobre la superficie de los platos de cultivo.

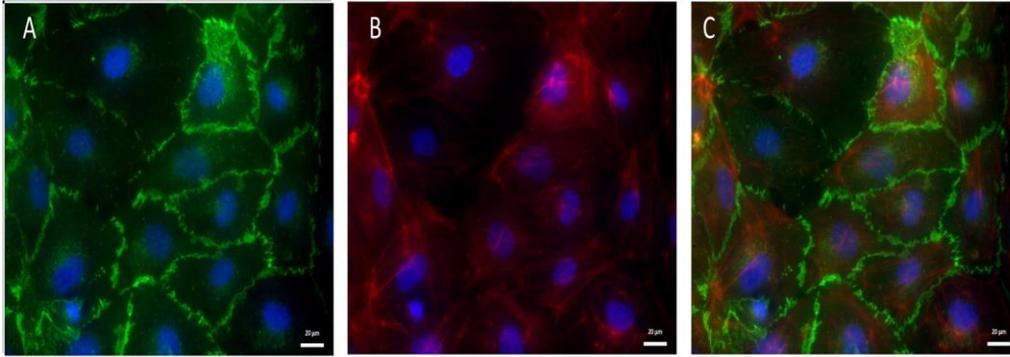


Figura 15. Observaciones con microscopía de fluorescencia del cultivo 2D. (A) HCAEC marcadas con anticuerpo monoclonal anti-VE-cadherina -verde- y DAPI -azul; (B) HCAEC marcadas con rodamina (rojo) para visualizar filamentos de F-actina; (C) Sobreposición de imágenes para visualizar VE-cadherina, citoesqueleto y núcleo. Escala: la barra representa una escala de 20 μm en todas las imágenes.

Debido al papel que tiene el factor Von Willebrand (vWF) en la homeostasis del tejido vascular, su identificación en los cultivos 3D fue considerada de interés. En la **Figura 16** se presentan imágenes de microscopía de fluorescencia del cultivo 3DCE. Se observa la inmunodetección de vWF en las células HCAEC (**Figura 16B**), cerca de los núcleos celulares (**Figura 16C**). Desafortunadamente, en los cultivos 3DGCE no se pudo detectar vWF, probablemente porque el anticuerpo no ingresó a las células debido a que el Geltrex presente promovió su agregación en los soportes.

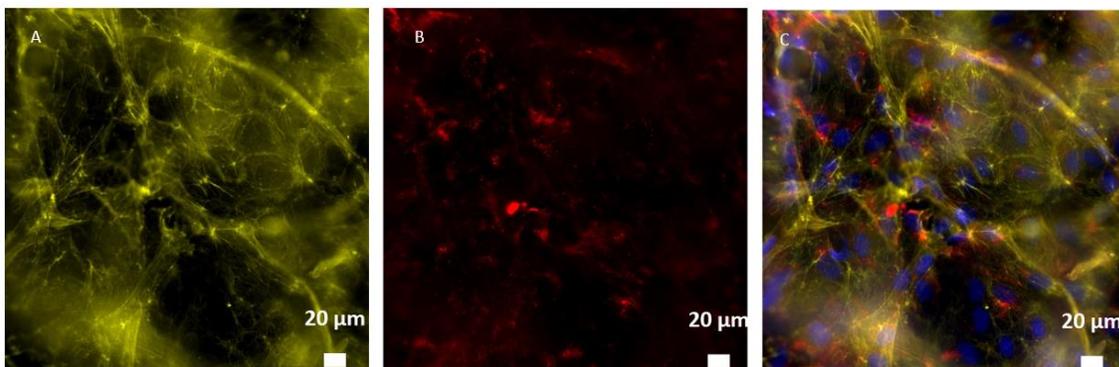


Figura 16. Inmunodetección del factor Von Willebrand (vWF) en la superficie apical del cultivo 3DCE. (A) Red de filamentos de F-actina; (B) Localización de vWF; (C) Localización de vWF, filamentos de F-actina y núcleos. La barra en las imágenes corresponde a una escala de 20 μm . Rodamina (amarillo), anti-vWF (rojo), DAPI (azul).

5.1.7. Efecto del LPS de Periodontopatógenos en las Interacciones Célula-Célula en el Cultivo 3DCE

Las adhesiones célula-célula mantienen la integridad de la barrera endotelial favoreciendo su función. En este trabajo se quiso evaluar microscópicamente su alteración después de exponer los cultivos 3DCE a LPS-P.g y LPS-A.a (**Figura 17**). Una imagen fluorescente de un cultivo confluyente antes de exponerse a los LPSs es presentada en la **Figura 17A**. Con el fin de interrumpir estas interacciones, se hizo un tratamiento con EDTA para quelar el calcio necesario para mantener la estructura de las proteínas de adhesión (Kim et al. 2011) (**Figura 17B**). La exposición del cultivo 3DCE a LPS-A.a indujo disminución de las interacciones célula-célula y de la confluencia del cultivo (**Figura 17C**). Se observó el mismo fenómeno en cultivos 3DCE tratados con LPS-P.g (**Figura 17D**).

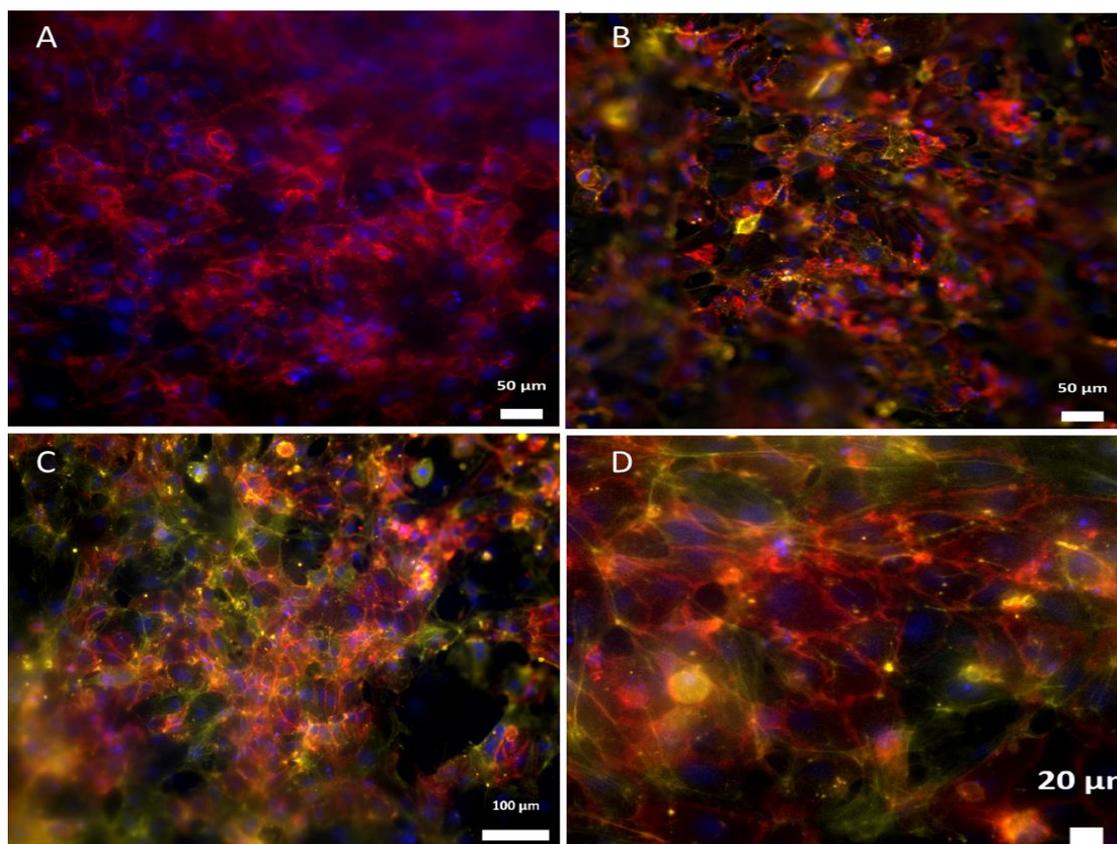


Figura 17. Imágenes Fluorescentes del cultivo 3DCE tratado con LPS de periodontopatógenos. HCAEC fueron cultivadas (18×10^3 células/mm²) por 7 días sobre soportes de colágeno no entrecruzado (A), posteriormente fueron tratadas con 2 mM de EDTA por 2 h (B), o expuestas por 24 h con 1 µg/mL de LPS-A.a (C) o LPS-P.g (D). Los cultivos celulares fueron fijados, permeabilizados y marcados con DAPI (azul), Anti-PECAM-1 (rojo), Rodamina falloidine (amarillo); para la detección de núcleos, membrana celular y filamentos de F- actina por microscopia de fluorescencia, respectivamente.

5.1.8. Resistencia transepitelial de los cultivos 3D

Una vez evidenciada la formación de uniones entre las células endoteliales cultivadas, se midió la resistencia eléctrica trans-endotelial (*TEER*) para evaluar la integridad de la barrera endotelial. Las mediciones de los valores *TEER* de los cultivos 3DCE, 3DGCE se hicieron después del tercer día de cultivo durante 7 días. Como control negativo se incluyeron soportes sin células, preparados sobre la cara apical de los insertos (3D); como control positivo, monocapas endoteliales confluentes cultivadas sobre la superficie apical de la membrana de poliestireno que hace parte de los insertos transwell (CE-Tw) (**Figura 18**). En todos los casos, los valores de *TEER* se mantuvieron constantes durante el tiempo del análisis. Estos valores fueron mayores en el control positivo que en los cultivos 3DCE y 3DGCE. A su vez, los valores de *TEER* de los cultivos 3D fueron mayores que los obtenidos con el control negativo

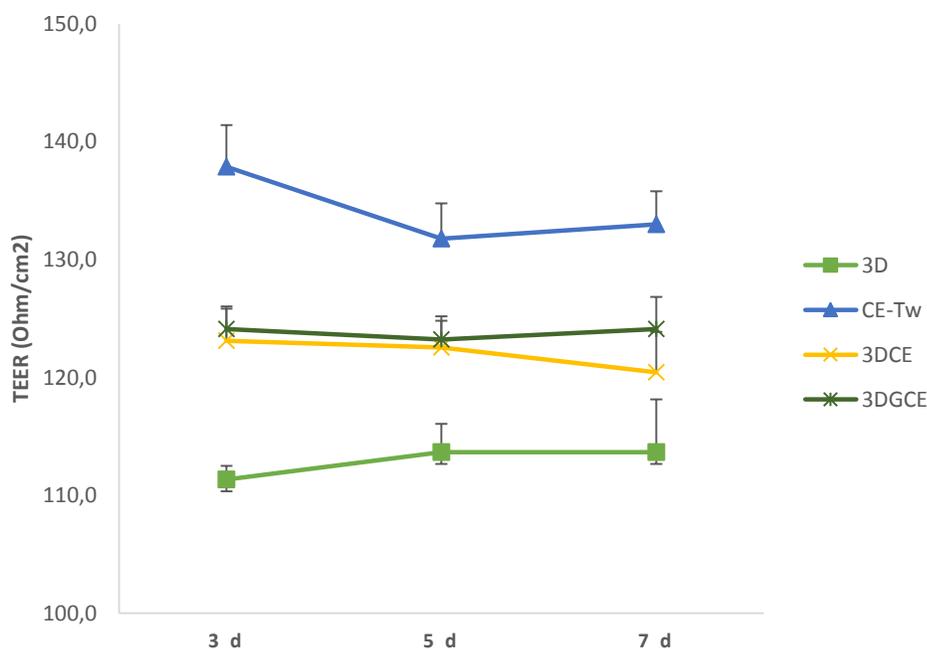


Figura 18. Resistencia Eléctrica Trans-Endotelial (TEER). HCAEC sembradas en las membranas de poliestireno de los insertos transwell: (CE-Tw); Cultivos 3DCE; Cultivos 3DGCE; soportes acelulares y no entrecruzados de colágeno preparados sobre insertos transwell: (3D). Al menos tres mediciones por inserto fueron registradas y el promedio de los valores *TEER* de tres replicas fueron graficados para cada uno de los tiempos.

5.1.8 Evaluación de la proliferación celular.

Durante 15 días se evaluó la proliferación celular en los cultivos 3DCE y 3DGCE. Los resultados indican que la tasa de proliferación de las células en los cultivos 3DCE fue mayor que en los cultivos 3DGCE durante la primera semana; igualmente, que fue la misma durante la segunda semana (**Figura 19**).

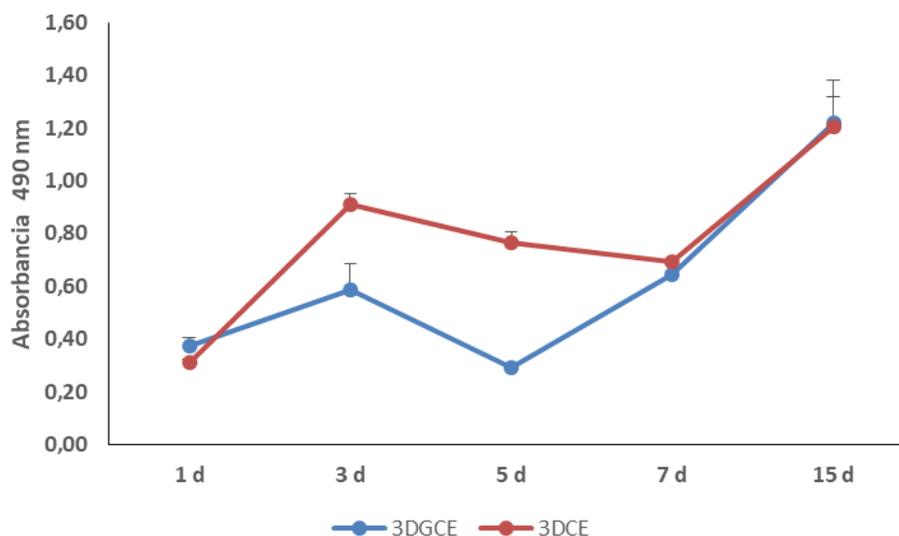


Figura 19. Curva de proliferación de células HCAEC sembradas en soportes de colágeno I. Cultivos 3DCE (—); Cultivos 3DGCE (—). Cada valor representa la media y la desviación estándar de un experimento llevado a cabo por triplicado (n=3).

Teniendo en cuenta los resultados de microscopía de fluorescencia y evaluación de la proliferación celular, se decidió utilizar el cultivo 3DCE para estudiar la respuesta de las HCAECs a la presencia de lipopolisacáridos aislados de microorganismos periodontopatógenos.

5.2 Caracterización de LPSs Purificados de Periodontopatógenos

Los LPSs fueron extraídos, purificados y re-purificados de las cepas *P. gingivalis* W83 y *A. actinomycetemcomitans* 29522. La **Figura 20** presenta el análisis electroforético de LPSs de *P. gingivales* W83 y otras bacteria Gram negativas, usadas para comparar y determinar el quimiotipo del LPS de *P. gingivalis* W83. En el carril 1 se observa el patrón de peso (66-21 KDa), en los carriles 2 y 3 el perfil electroforético de LPSs comerciales de *Escherichia coli*

y *Salmonella typhimurium*, caracterizados por presentar diferentes bandas en el electroferograma y clasificados como lisos porque poseen las 3 regiones características del LPS (antígeno A, núcleo y lípido A). En el carril 4 se observa el perfil de LPS de *Rhodobacter sphaeroides*; se aprecia una banda de bajo peso molecular característica de los electroferogramas de los LPSs de tipo rugoso, los cuales están constituidos por lípido A y núcleo. En el carril 5 se presenta el perfil de bandas del LPS aislado de *P. gingivalis* W83. Se observan bandas de mediano y bajo peso molecular, con un patrón característico de los LPSs semirugosos caracterizados por poseer una región incompleta del antígeno O (**Figura 20A**). El barrido espectrofotométrico mostró la formación de un único pico de absorción cercano a 200 nm característico de los LPSs; el cual, indica la ausencia de contaminantes nucleicos y proteínas (**Figura 20B**).

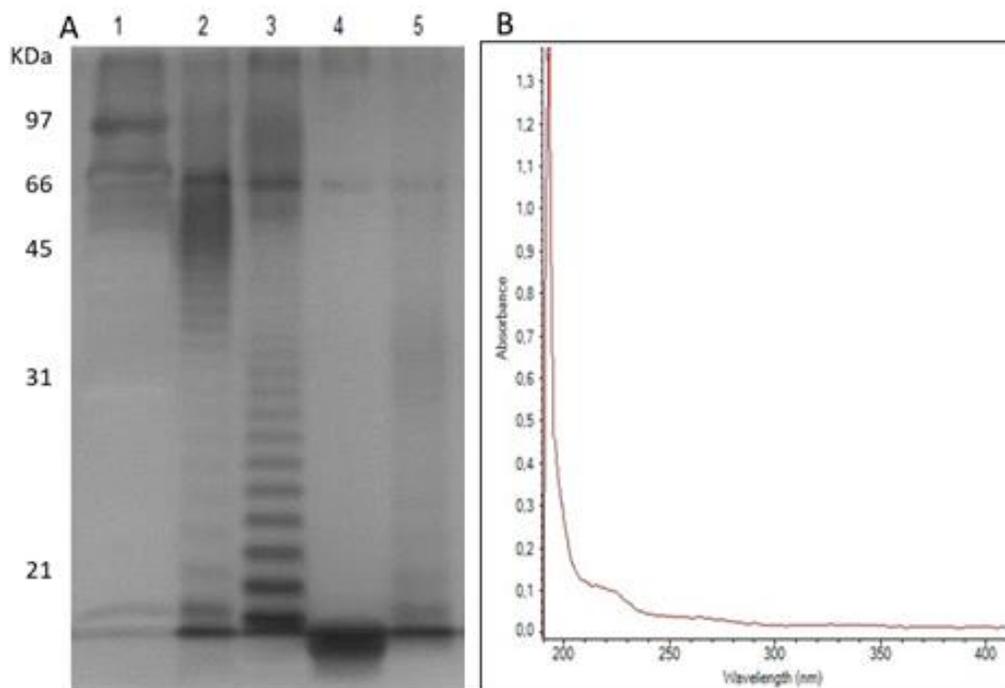


Figura 20. Caracterización de LPS aislado de *P. gingivalis* W83. (A) Perfil electroforético de LPSs. Carriles: (1) Marcador de peso molecular LMW; (2) LPS de *E. coli*; (3) LPS de *S. typhimurium*, 4) LPS *R. sphaeroides*, 5) LPS *P. gingivalis* W83. (B) Barrido espectrofotométrico del extracto re-purificado de LPS *P. gingivalis* W83.

La caracterización del LPS aislado y purificado de *A. actinomycetemcomitans* (**Figura 21**), evidencia la presencia de bandas de mediano y bajo peso molecular características de los LPS de tipo semirugoso (**Figura 21A**). El barrido espectrofotométrico mostró la formación de un

único pico de absorción cercano a 200 nm, libre de contaminantes nucleicos y proteínas (**Figura 21B**).

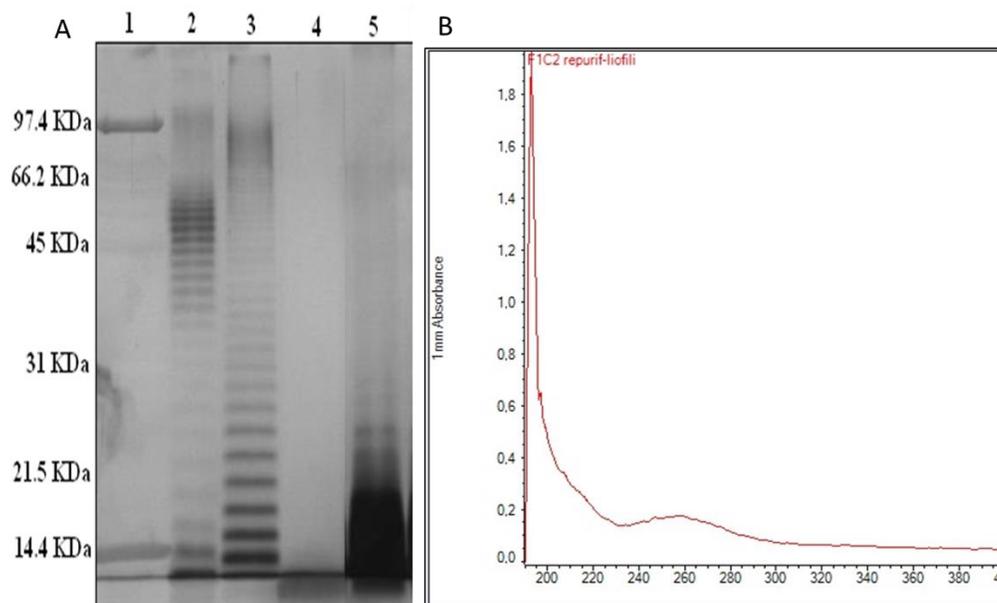


Figura 21. Caracterización de LPS aislado de *A. actinomycetemcomitans* 29522. (A) Perfil electroforético de LPSs. Carriles: (1) Marcador de peso molecular LMW; (2) LPS de *E. coli*; (3) LPS de *S. typhimurium*, 4) LPS *R. sphaeroides*, 5) LPS *A. actinomycetemcomitans*. (B) Barrido espectrofotométrico del extracto re-purificado de LPS *P. gingivalis* W83.

Los datos presentados confirman el aislamiento, purificación y caracterización de los LPSs de *P. gingivalis* W83 (LPS-P.g) y *A. actinomycetemcomitans* 29522 (LPS-A.a). Estas moléculas fueron utilizados en los experimentos realizados para evaluar la respuesta de los cultivos de HCAEC tridimensionales (3DCE) y bidimensionales (2DCE) a la presencia de LPS de periodontopatógenos, que se describen a continuación.

5.3 Inducción de la Transcripción de Genes de Quimoquinas por LPS de Periodontopatógenos

La interleuquina 8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) son citoquinas quimioatrayentes, que *in vitro* e *in vivo* han sido inducidas por periodontopatógenos y/o sus factores de virulencia (Kobayashi-Sakamoto et al. 2003; Hashizume et al. 2011; Rodrigues et al. 2012). Por ésta razón, fueron cuantificados relativamente en cultivos 3DCE y 2DCE expuestos y no expuestos (control) a LPS-P.g y LPS-A.a. La **Figura 22** muestra que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de transcripción de los genes evaluados en

los dos cultivos evaluados. En los cultivos 2DCE expuestos a LPS-A.a, la transcripción del gen MCP-1 fue 5 veces mayor que en sus controles; mientras que en los cultivos 3DCE, la expresión fue tres veces mayor que la observada en sus controles (**Figura 22A**). La presencia de LPS-A.a resultó en aumento de la transcripción en los dos tipos de cultivos con respecto a sus controles; sin embargo, se observaron diferencias en la intensidad de ésta respuesta. La transcripción del gen que codifica para IL-8 aumentó 15 veces en los cultivos 2DCE con respecto a sus controles y 12 veces en los 3DCE con respecto a sus controles (**Figura 22B**). Por el contrario, el tratamiento con LPS-P.g no afectó la expresión de los genes evaluados en ninguno de los dos tipos de cultivo. No se observaron diferencias entre los modelos 2DCE y 3DCE luego del estímulo con LPS.

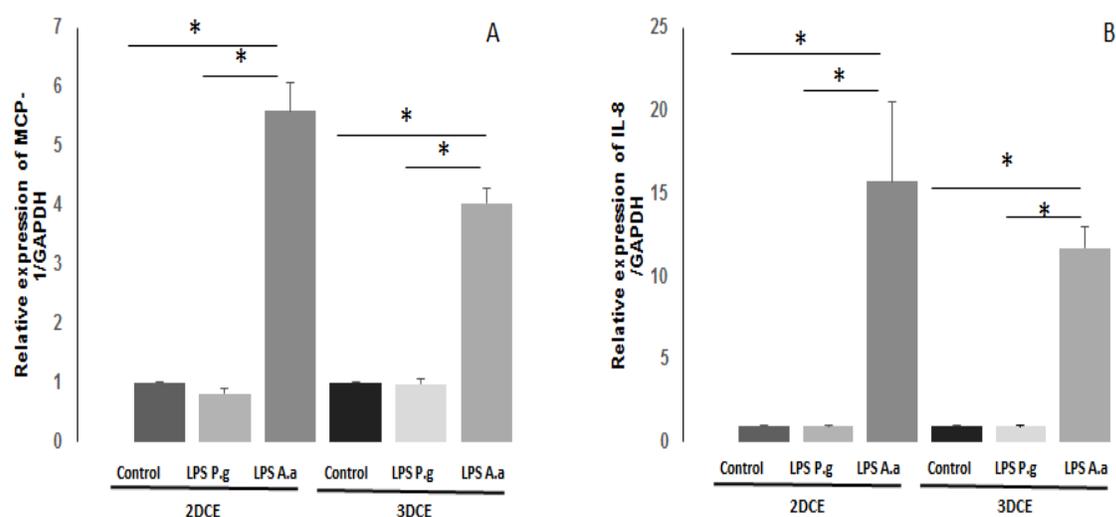


Figura 22. Evaluación por RT-qPCR de la transcripción de los genes MCP-1 e IL-8. Cultivos 2DCE y 3DCE fueron estimuladas con 1 μ g/ mL LPS de periodontopatógenos por 24 h. (A) Transcripción relativa del gen MCP-1; (B) Transcripción relativa del gen IL-8. Gen constitutivo: GAPDH. Los datos son presentados como la media \pm ESM. El asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento y su control.

5.4 Inducción de la Transcripción de Genes de Proteínas que Participan de la Función Endotelial por LPS de Periodontopatógenos

Las proteínas COX, eNOS e iNOS cumplen un papel importante en la regulación de la síntesis de prostaglandinas y óxido nítrico; el factor von Willebran (vWF), es una glicoproteína reguladora clave del proceso de la coagulación. Todos ellos son modulados cuando hay daño endotelial, por eso, frecuentemente son evaluados en estudios *in vitro* e *in vivo* de disfunción endotelial. Por lo anterior, este trabajo evaluó y comparó la transcripción

relativa de los genes que codifican para COX-2, eNOS y vWF en cultivos 3DCE y 2DCE expuestos y no expuestos (control) a LPS-P.g y LPS-A.a (**Figura 23**).

En los cultivos 2DCE expuestos a LPS-A.a la transcripción del gen COX-2 aumentó significativamente ($p < 0.05$) con respecto a los cultivos expuestos a LPS-P.g y control; sin embargo, entre los cultivos expuestos a LPS-P.g y control no se observaron diferencias significativas (**Figura 23A**). En los cultivos 3DCE expuestos a LPS-A.a y LPS-P.g la transcripción del gen COX-2 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control y no hubo diferencias significativas entre los cultivos expuestos a los dos lipopolisacáridos (**Figura 23B**).

La transcripción relativa del gen eNOS en los cultivos 2DCE, aumentó en presencia de LPS-P.g con respecto al control; sin embargo, disminuyó por el tratamiento con LPS-A.a (**Figura 23C**). En los cultivos 3DCE tratados con los dos tipos de LPS la transcripción relativa de este gen disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control, pero no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos (**Figura 23D**). Por dificultades en su amplificación, no se pudo cuantificar la transcripción del gen iNOS.

No se observaron diferencias significativas en la transcripción relativa del gen vWF en los cultivos 2DCE, tratados con los dos tipos de LPS y control (**Figura 23E**). Contrariamente, en los cultivos 3DCE se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), en los cultivos tratados con los dos LPSs y el control, ya que la transcripción disminuyó. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la transcripción relativa entre los dos tratamientos (**Figura 23F**). Al realizar la comparación en la transcripción de los genes (COX-2, eNOS, vWF) para un mismo tratamiento entre los modelos 2DCE y 3DCE no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

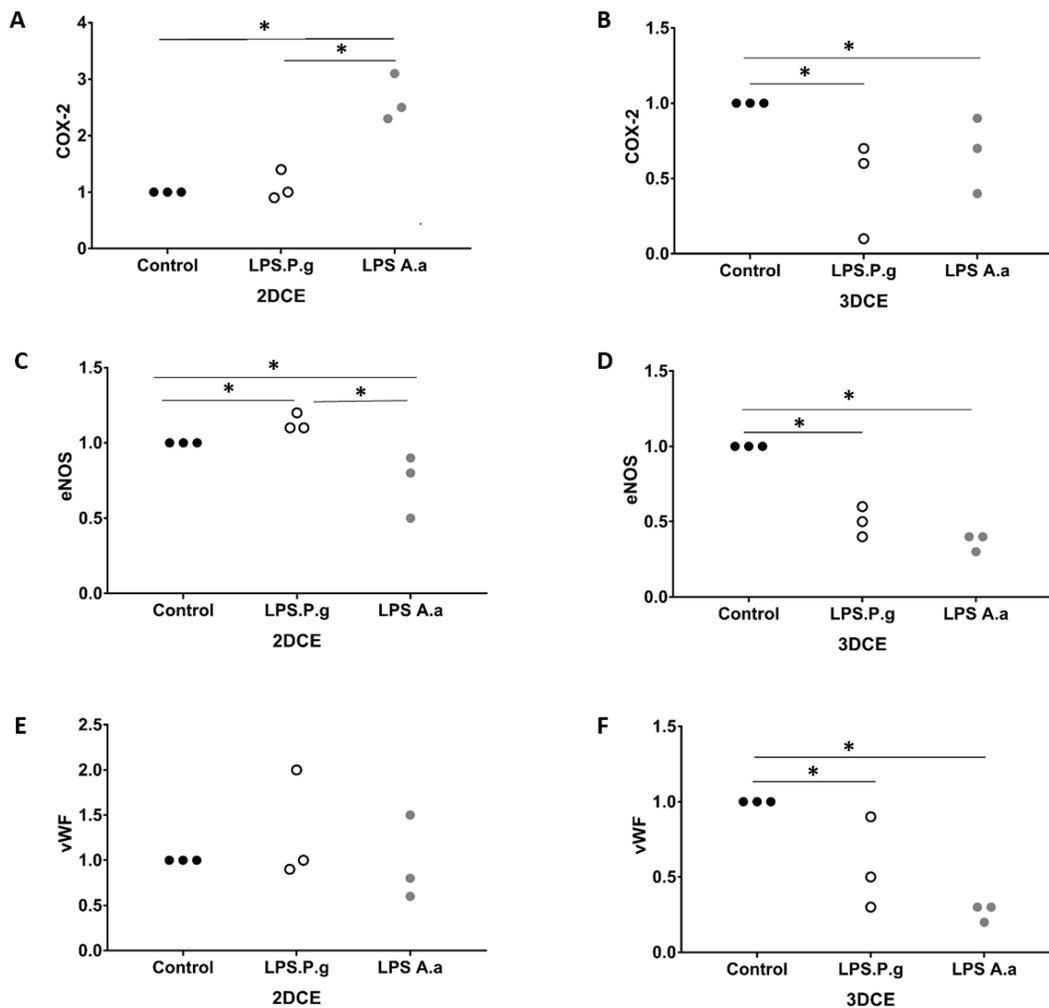


Figura 23. Evaluación por RT-qPCR de la transcripción de los genes COX2, eNOS y vWF. Cultivos 2DCE y 3DCE fueron estimuladas por 24 h con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS-P.g o LPS-A.a. Cultivos no expuestas a LPS fueron usados como control. Cada tratamiento fue realizado en tres experimentos independientes. (A) Expresión relativa del gen COX-2 en 2DCE; (B) Expresión relativa del gen COX-2 en 3DCE; (C) Expresión relativa del gen eNOS en 2DCE; (D) Expresión relativa del gen eNOS en 3DCE; (E) Expresión relativa del gen vWF en 2DCE; (F) Expresión relativa del gen vWF en 3DCE. Gen constitutivo: GAPDH. El asterisco (*) representa las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

5.5. Perfil de Secreción de Citoquinas en los Modelos 2DCE y 3DCE y Análisis de Componentes Principales (APC)

Empleando un arreglo de anticuerpos, se evaluaron y cuantificaron 40 citoquinas en los medios de los cultivos 2DCE y 3DCE tratados o no con LPS-A.a o LPS-P.g. Las citoquinas evaluadas son presentadas en la **Tabla 4**. La comparación de los datos obtenidos en los modelos sin tratamiento (control), mostró que en el cultivo 3DCE el número de citoquinas detectadas (29 de 40) fue mayor que el número de citoquinas detectado en el cultivo 2DCE (16 de 40). Comparados con los cultivos control, los cultivos tratados con LPS-A.a

incrementaron el número de citoquinas identificadas en ambos modelos celulares: 34 citoquinas en 3DCE y 22 citoquinas en 2DCE. Por otro lado, en los cultivos 2DCE y 3DCE tratados con LPS-P.g no se incrementó el número de citoquinas detectadas. Además, independiente del tratamiento se observó una mayor concentración de citoquinas secretadas en el modelo 3DCE que en el modelo 2DCE.

Con los valores de concentración encontrados para cada citoquina en cada uno de los modelos y tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales (*PCA*). Los componentes principales permiten agrupar variables (concentraciones de citoquinas), reduciendo la complejidad del modelo y destacando los factores que más fuertemente contribuyen a la agrupación de los datos (Regier et al. 2017). Como resultado del *PCA* se usaron solamente los dos primeros componentes resultantes, los cuales presentaron más del 80% de la variación total. La **Figura 24** indica que el perfil de secreción de las células de los cultivos 3DCE estimulados con LPS-A.a (puntos verdes), es diferente al perfil de los cultivos 2DCE (puntos cafés). Igualmente, que hay diferencias en los perfiles de los cultivos 3DCE, control y tratados con LPS-P.g, con los 2DCE, control y 2DCE LPS-Pg. Los datos descritos, sugieren que los cultivos estudiados exhiben perfiles de secreción de citoquinas que son diferentes.

Tabla 4. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos 2DCE/3DCE y tratados con LPS de periodontopatógenos

#	Citoquina	Modelo 2DCE [pg/mL]			Modelo 3DCE [pg/mL]			LD
		control	LPS-P.g	LPS-A.a	Control	LPS-P.g	LPS-A.a	
1	BLC	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	1,3
2	Eotaxin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1
3	Eotaxin-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6
4	G-CSF	1,0	0,1	1.508,9	21,3	15,2	1.608,2	11,0
5	GM-CSF	0,3	0,4	5,0	5,1	3,1	12,5	1,3
6	I-309	0,0	0,0	0,0	1,2	0,5	9,3	6,4
7	ICAM-1	55,7	49,3	742,1	336,3	215,7	1.022,5	47,7
8	IFNg	0,0	0,5	0,0	65,8	44,9	92,6	18,7
9	IL-1a	25,0	21,2	32,8	98,0	51,7	81,9	3,2
10	IL-1b	0,1	1,0	10,3	3,1	2,7	18,8	1,4
11	IL-1ra	3,6	6,6	4,5	53,4	38,2	89,5	9,3
12	IL-2	0,2	0,7	0,7	13,4	8,5	16,7	3,9
13	IL-4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	2,2	3,6
14	IL-5	0,0	0,0	0,0	12,4	3,9	14,8	13,2
15	IL-6	15,4	13,8	316,7	19,0	12,5	299,7	2,3
16	IL-6R	0,0	0,0	0,0	16,1	9,5	9,9	11,4
17	IL-7	7,2	7,4	7,8	30,8	19,0	38,1	14,8
18	IL-8	46,4	37,6	136,3	47,8	51,0	143,5	0,4
19	IL-10	0,3	0,3	0,2	7,0	4,6	10,9	4,0
20	IL-11	99,3	69,3	41,6	744,7	383,2	941,6	42,1
21	IL-12p40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	5,8
22	IL-12p70	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,5	0,5
23	IL-13	0,1	0,6	1,6	1,4	0,8	3,7	1,7
24	IL-15	0,0	0,1	0,0	1,2	1,7	3,5	6,5
25	IL-16	2,1	5,5	4,3	32,8	23,0	45,3	13,9
26	IL-17	0,0	0,0	0,0	1,2	0,5	2,1	2,8
27	MCP-1	151,3	190,6	206,1	198,3	203,2	196,7	1,6
28	MCSF	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	1,4	2,3
29	MIG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	3,8
30	MIP-1a	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	9,1
31	MIP-1b	0,0	0,1	8,8	0,1	0,0	7,2	1,0
32	MIP-1d	0,9	0,0	0,0	0,2	2,2	2,0	6,4
33	PDGF-BB	132,3	100,0	140,8	428,5	291,3	434,5	3,6
34	RANTES	69,9	65,8	366,5	65,0	55,5	281,7	13,6
35	TIMP-1	2.432,4	2.500,2	2.317,4	2.647,1	2.789,8	2.622,5	23,0
36	TIMP-2	4.226,8	4.456,0	4.063,9	6.283,8	5.748,7	6.034,2	25,6
37	TNFa	0,8	1,7	3,1	27,5	15,6	34,9	7,5
38	TNFb	1,8	2,0	2,7	11,1	8,0	15,4	18,9
39	TNF RI	82,0	22,8	334,8	438,6	427,6	719,5	34,2
40	TNF RII	14,5	9,3	8,3	88,8	78,7	75,5	25,4
	Total	16/40	17/40	22/40	29/40	27/40	34/40	> 1 pg/mL

Colores- Rojo: no detectado o menor a 1 pg/ml; Naranja: concentración baja; Amarillo: concentración media; Verde: concentración alta. LD: Límite de detección. Cada valor representa el promedio obtenido a partir del análisis de 3 muestras independientes valoradas por cuadruplicado.

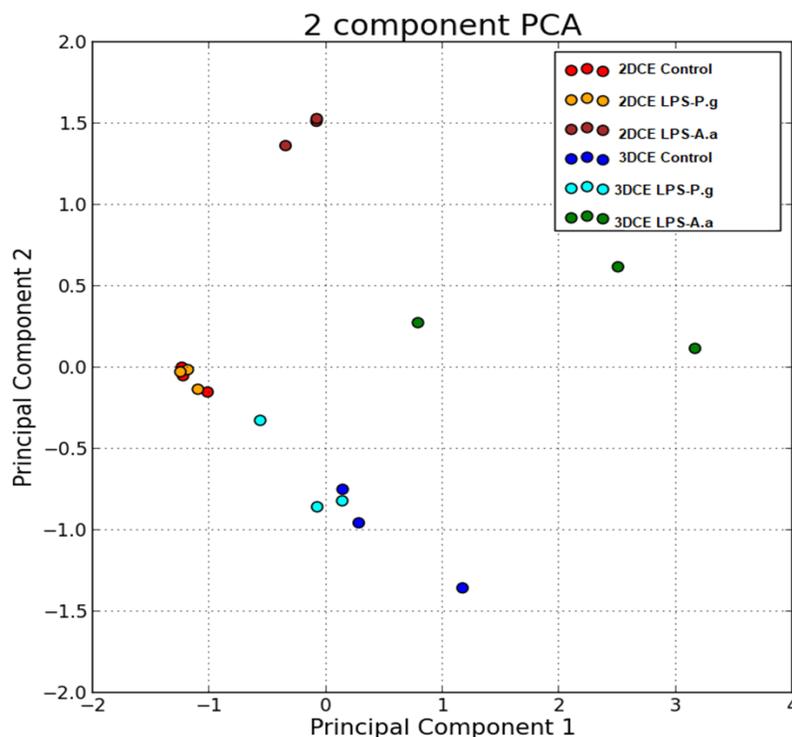


Figura 24. Análisis de Componentes Principales. Los puntos en la figura representan los valores de tres muestras independientes por cada tratamiento en cada uno de los modelos celulares.

5.6 Análisis del Perfil de Secreción de Citoquinas de las HCAEC en los Cultivos 2DCE y 3DCE

Una vez cuantificadas y agrupadas en componentes principales, se procedió con el análisis de la secreción diferencial de las citoquinas en cada uno de los modelos utilizados. Inicialmente, se evaluaron las citoquinas quimioattractantes o quimoquinas detectadas en los modelos 2DCE y 3DCE antes y después de ser tratados con LPS-A.a y LPS-P.g (**Figura 25**). En los dos tipos de cultivos, el tratamiento con LPS-A.a incrementó significativamente ($p < 0.05$) la concentración de IL-8 y RANTES con respecto a los controles (**Figura 25A, B**). Por el contrario, el tratamiento con LPS-P.g no cambió significativamente la secreción de ninguna de éstas moléculas. También, se encontró que en los dos tipos de cultivo la secreción de IL-16 no fue diferente en los tratamientos y controles; aunque, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los cultivos 3DCE que en los cultivos 2DCE (**Figura 25C**). Finalmente, en los cultivos 2DCE la secreción de PDGF-BB en los controles y tratamientos no varió; sin

embargo, en los cultivos 3DCE tratados con LPS-P.g la secreción de esta quimioquina disminuyó en comparación con el control y con el tratamiento con LPS-A.a (**Figura 25D**).

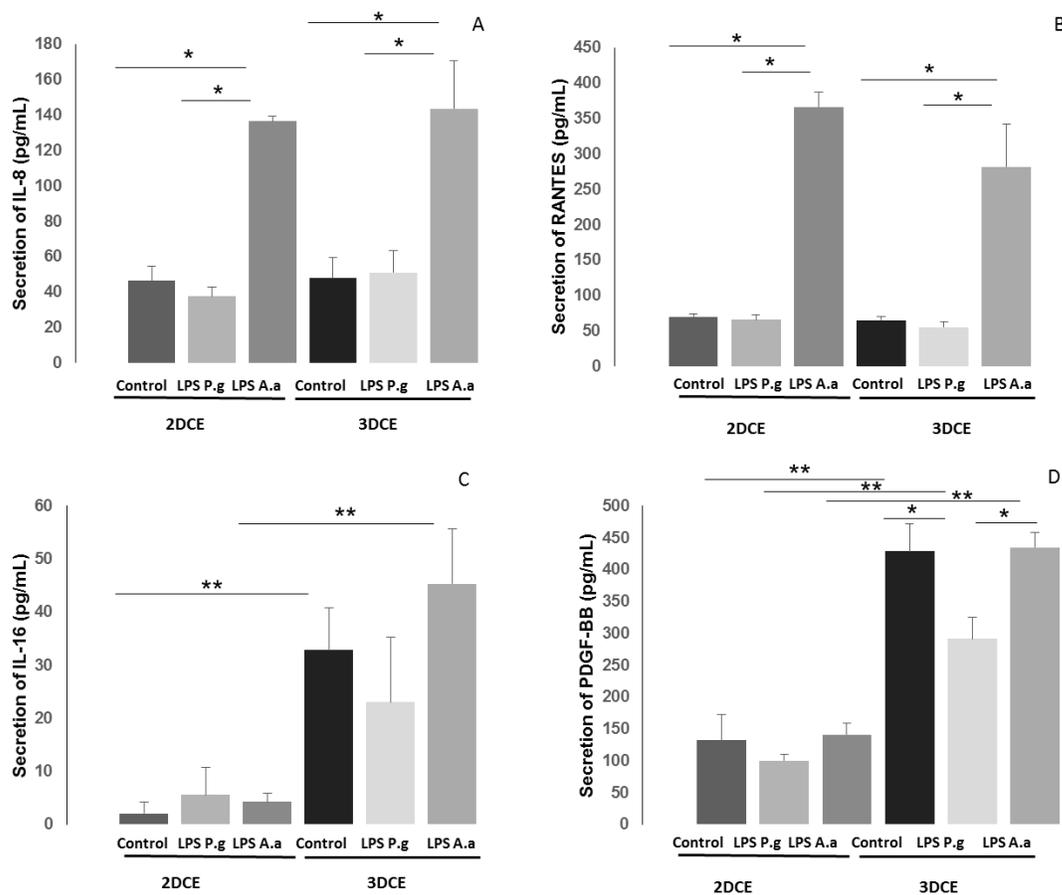


Figura 25. Secreción de quimioattractantes en los cultivos 2DCE y 3DCE. Cultivos 2DCE y 3DCE estimuladas o no con LPS de periodontopatógenos 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h. (A) IL-8, (B) RANTES, (C) IL-16, (D) PDGF-BB. Los datos son presentados como la media \pm ESM. * Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento y el control. ** Diferencias significativas ($p < 0,05$) para un mismo tratamiento entre el cultivo 2D y 3D.

La Figura 26 muestra las concentraciones encontradas de G-CSF, IL-6, IL-11, TNF- α , IL-1ra y TNF-R1. En los cultivos 2DCE y 3DCE tratados con LPS-A.a, las concentraciones de IL-6 y G-CSF fueron mayores que en los controles. Por el contrario, en los cultivos estimuladas con LPS-P.g no se observaron diferencias (**Figuras 26A & B**). En los cultivos 2DCE tratados y controles, las concentraciones de IL-11 no cambiaron. Sin embargo, en los cultivos 3DCE tratados con LPS-P.g su secreción disminuyó y en los expuestos a LPS-A.a aumentó (**Figura 26C**). La concentración de TNF- α en los cultivos 2DCE tratados y controles, no cambió ($p > 0,05$); sin embargo, en los cultivos 3DCE tratados con LPS-A.a incrementó ($p < 0,05$) con respecto a los cultivos tratados con LPS-P.g (**Figura 26D**). Las concentraciones de IL-1ra en los cultivos 2DCE y 3DCE no fueron significativamente

diferentes en controles y tratamientos; se detectaron diferencias cuando se compararon las concentraciones encontradas en los cultivos 2DCE con las de los cultivos 3DCE, ya que en estos últimos las concentraciones fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que en los primeros (**Figura 26E**). En los cultivos 2DCE la concentración de TNF-RI disminuyó ($p < 0.05$) en presencia de LPS-P.g y aumentó ($p < 0.05$) en presencia de LPS-A.a (**Figura 26F**). Por el contrario, no hubo diferencias entre el control y los tratamientos en los cultivos 3DCE ($p > 0.05$).

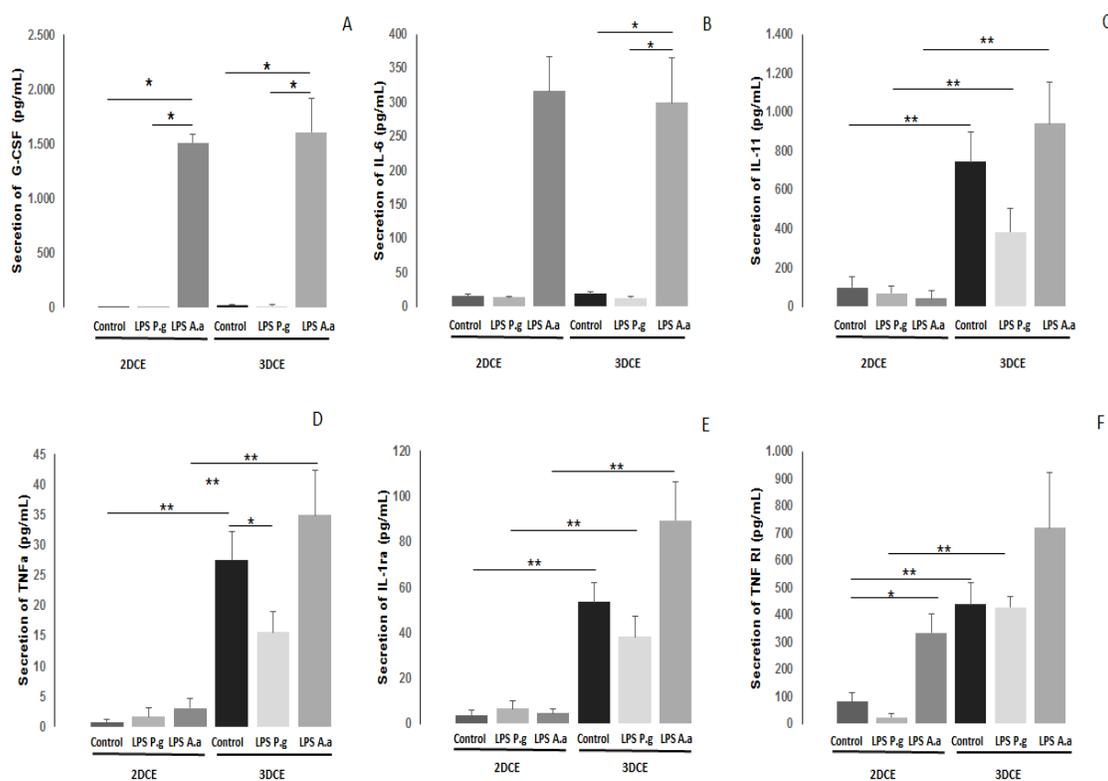


Figura 26. Cuantificación de citoquinas en medios de cultivos 2DCE y 3DCE. (A) G-CSF, (B) IL-6, (C) IL-11, (D) TNF α , (E) IL-1ra, (F) TNF RI. Los datos son presentados como la media \pm ESM. * Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento y el control. ** Diferencias significativas ($p < 0.05$) para un mismo tratamiento entre el cultivo 2D y 3D.

La Tabla 5 resume las mayores diferencias encontradas en la concentración de los factores secretados por las HCAEC en los medios de los cultivos 3DCE y 2DCE tratados con LPS de periodontopatógenos. En ella se incluyen los factores que en cada modelo tuvieron concentraciones significativamente diferentes en los controles y tratamientos. En el modelo 2DCE los cultivos tratados con LPS-A.a secretaron diferencialmente -con respecto a su

control- el factor de crecimiento G-CSF, las quimoquinas IL-8 y RANTES, la molécula de adhesión ICAM-1 y el receptor TNFRI. Sin embargo, al comparar los cultivos 2DCE estimulados con LPS-P.g con sus controles, no se encontraron diferencias en la secreción de ninguno de los factores evaluados. El comportamiento del modelo 3DCE fue diferente al del 2DCE. Con relación a sus controles, los cultivos 3DCE estimulados con LPS-A.a secretaron concentraciones de la interleuquina proinflamatoria IL-6, el factor de crecimiento G-CSF, las quimoquinas IL-8 y RANTES y la molécula de adhesión ICAM-1 significativamente diferentes. En los cultivos 3DCE tratados con LPS-P.g se pudieron cuantificar TNF α y el factor de crecimiento PDGF-BB, encontrándose una disminución significativa de sus concentraciones con respecto a los cultivos control. Finalmente, en la tabla se evidencia que la secreción de citoquinas en los cultivos control 2DCE y 3DCE también fue diferente.

Tabla 5. Mayores diferencias en la secreción de citoquinas en HCAEC cultivadas en modelos 2D y 3D frente al estímulo de LPS de periodontopatógenos

Factores	2DCE Control	2DCE LPS-P.g	2DCE LPS-A.a	3DCE Control	3DCE LPS-P.g	3DCE LPS-A.a
Citoquinas inflamatorias	N.S	N.S	N.S	TNF α ^(c) IL-2	TNF α ^(b)	IL-6 ^(b)
Factores de crecimiento y diferenciación	N.S	N.S	G-CSF ^(a)	PDGF-BB ^(c) IL-7 ^(c)	PDGF-BB ^(b)	G-CSF ^(b)
Quimioquinas	N.S	N.S	IL-8 ^(a) RANTES ^(a)	IL-16 ^(c)	N.S	IL-8 ^(b) RANTES ^(b)
Moléculas de adhesión celular	N.S	N.S	ICAM-1 ^(a)	ICAM-1 ^(c)	N.S	ICAM-1 ^(b)
Receptores	N.S	N.S	TNFRI ^(a)	TNFRI ^(c) TNFRII ^(c) IL-1ra ^(c)	N.S	N.S
Anti-inflamatorios	N.S	N.S	N.S	IL-10 ^(c) IL-11 ^(c)	N.S	N.S
Inhibidores de Metaloproteasas	N.S	N.S	N.S	TIMP-2 ^(c)	N.S	N.S

(a) Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la concentración secretada en 2DCE control para ese factor soluble

(b) Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la concentración secretada en 3DCE control para ese factor soluble.

(c) Diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración secretada para ese factor soluble entre controles 2DCE y 3DCE.

N.S: No significativo

5.7 Adhesión de Monocitos a HCAEC Estimuladas con LPS de Periodontopatógenos

Los resultados del ensayo de adhesión de monocitos a HCAEC cultivadas en los modelos 2DCE y 3DCE son mostrados en la **Figura 27**. En el modelo 2DCE no se observaron diferencias significativas en la adhesión de monocitos entre el control y los cultivos expuestos a LPS-P.g; sin embargo, si hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en la adhesión en los cultivos tratados con LPS-A.a con relación al control y al cultivo estimulado con LPS-P.g (**Figura 27A**). Aunque en los cultivos 3DCE no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el control y los tratamientos (**Figura 27B**).

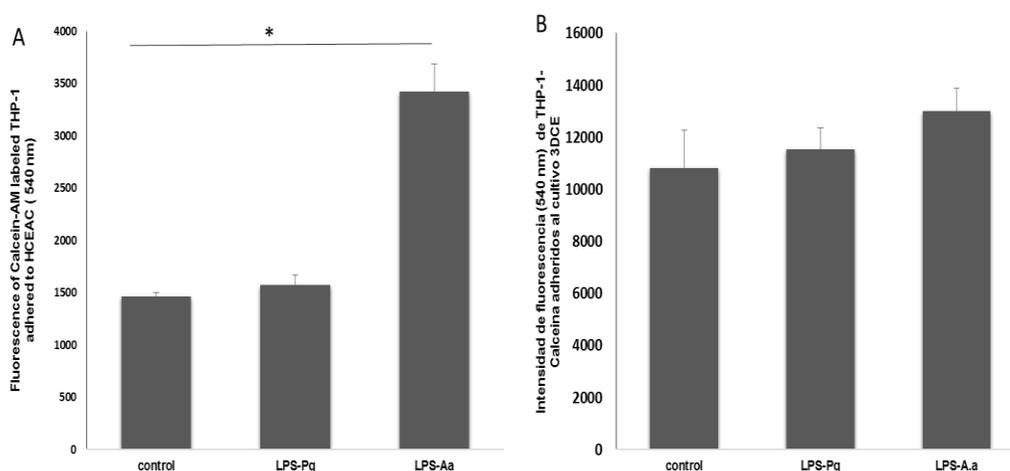


Figura 27. Adhesión de monocitos THP-1 a células HCAEC en cultivos 2DCE y 3DCE. Monocitos THP-1 marcados con calceína AM fueron adicionados a cultivos pretratados con periodontopatógenos. (A) 2DCE; (B) 3DCE. Se midió intensidad de fluorescencia de los monocitos adheridos. Los datos son presentados como la media \pm ESM. * diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

Debido a que no se encontraron diferencias de adhesión en los cultivos 3DCE, se analizó a través de los datos del arreglo de citoquinas (tabla # 4) la concentración de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la cual ha sido reportada por favorecer la unión de monocitos al endotelio activo, secretada en el modelo 3DCE y se comparó con la secretada en 2DCE bajo las diferentes condiciones de tratamiento (**Figura 28**). En los cultivos 2DCE la concentración de ICAM-1 soluble fue igual en los cultivos control y tratados con LPS-P.g; sin embargo, la concentración medida en los sobrenadantes de los cultivos expuestos a LPS-A.a fue diferente ($p < 0.05$). El mismo comportamiento fue observado en los cultivos 3DCE.

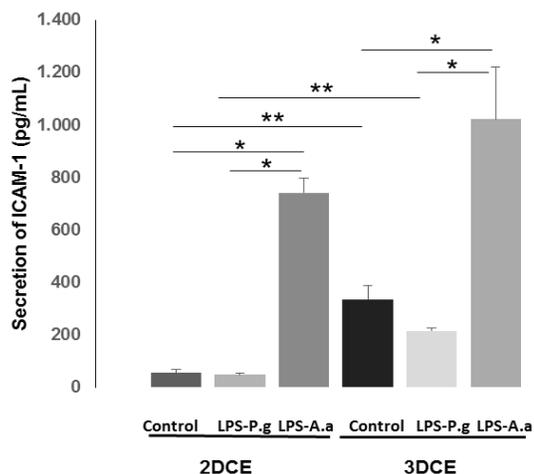


Figura 28. Secreción de la molécula de adhesión ICAM-1 en los cultivos 2D y 3D estimuladas con LPS de periodontopatógenos. Los datos son presentados como la media +/- ESM. * Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento y el control. ** Diferencias significativas ($p < 0,05$) para un mismo tratamiento entre el cultivo 2D y 3D.

5.8 Evaluación de la Secreción de Prostaciclina y Tromboxano en Cultivos 2DCE y 3DCE Estimulados con LPS de Periodontopatógenos

Se cuantificó la secreción de la prostaciclina PGI₂ y del tromboxano TXA₂ en los medios de los cultivos 2DCE y 3DCE estimuladas con LPS de periodontopatógenos (**Figura 29**). Se hizo una medición indirecta de PGI₂ y TXA₂ debido a que estas moléculas rápidamente se oxidan a 6-ceto-PGF α y TXB₂, respectivamente. Los resultados indican que la concentración de PGI₂ no varió en los cultivos 2DCE tratados con LPS-P.g y control; sin embargo, en los tratados con LPS-A.a esta concentración se incrementó 8 veces (**Figura 29A**). En los cultivos 3DCE el incremento fue de 7,6 veces después del tratamiento con LPS-A.a y tampoco hubo diferencias entre el control y el tratamiento con LPS-P.g (**Figura 29B**). Aunque en los cultivos 2DCE control y tratados, no hubo diferencias significativas en la concentración de TBX₂ (**Figura 29C**), en los cultivos 3DCE tratados con LPSs ésta aumentó significativamente. El aumento fue mayor en presencia del LPS-A.a (**Figura 29D**). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de PGI₂ y TXA₂ para un mismo tratamiento entre los dos modelos 2D y 3D.

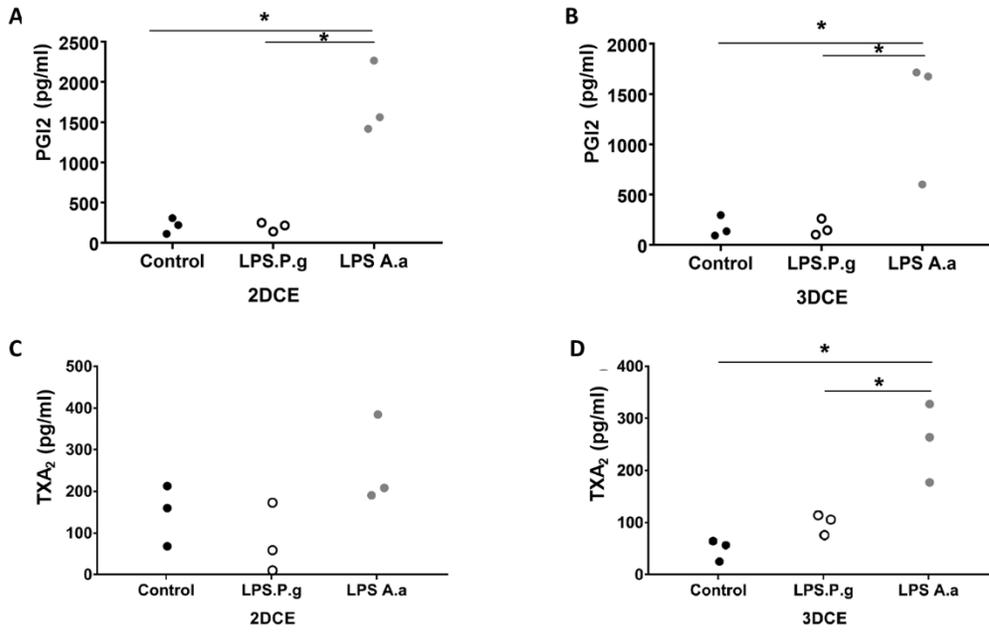


Figure 29. Concentración de PGI₂ y TXA₂ en medios de cultivos 2DCE y 3DCE estimulados con LPS de periodontopatógenos. Cultivos 2DCE y 3DCE fueron estimulados con 1 µg/ mL LPS de periodontopatógenos por 24 h, los sobrenadantes fueron recolectados y analizados por un ensayo ELISA para la cuantificación de PGI₂ (A, B) y TXA₂ (C, D). Cada condición fue valorada a partir de tres experimentos independientes por duplicado. El asterisco representa (*) diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre los tratamientos.

6. DISCUSIÓN

En este estudio se desarrolló y caracterizó un cultivo tridimensional constituido por células HCEAC sembradas sobre la cara apical de soportes de colágeno elaborados sobre insertos transwell. El cultivo denominado 3DCE, se usó como modelo *in vitro* para el estudio del efecto de dos LPS aislados de periodontopatógenos en monocapas de HCEAC. La detección inmunohistoquímica de moléculas localizadas en membrana celular o que intervienen en la formación de las uniones que se establecen entre las células endoteliales, permitió confirmar la formación de monocapas sobre los soportes de colágeno. El modelo desarrollado es importante porque con él se pudo demostrar que la secreción de factores solubles que modulan inflamación, función endotelial, recambio de la matriz extracelular, receptores de citoquinas, adhesión y crecimiento celular es significativamente diferente a la encontrada en HCAECs cultivadas en la superficie de platos de cultivo (cultivos 2DCE). También, porque evidenció que hay transcripción diferencial de genes que codifican para citoquinas, quimoquinas, enzimas (eNOS, COX) y factores (vWF) involucradas en la función endotelial y la inflamación en los cultivos 2DCE y 3DCE.

El colágeno permite la adhesión, proliferación, diferenciación y funcionamiento celular en entornos tridimensionales *in vitro* debido a que es un componente de la matriz extracelular de los tejidos (Rashedi et al. 2017). Al ser un sustrato de la lámina reticular sobre el cual reposa la lámina basal que subyace a la monocapa endotelial de los vasos sanguíneos, su presencia en cultivos *in vitro* proporciona a las células endoteliales un ambiente más natural que las superficies de los platos de cultivo. De ahí, que sea frecuentemente usado en ingeniería de tejidos para elaborar soportes utilizados en la producción de tejidos vasculares (Boccafoschi et al. 2005). Por las razones expuestas, el colágeno tipo I fue el biomaterial escogido para elaborar los soportes tridimensionales sobre los que se sembraron las HCAEC con el fin de que formaran monocapas confluentes. Otros autores han reportado la utilización de soportes elaborados con colágeno para obtener monocapas endoteliales confluentes (Alekseeva et al. 2014b). Incluso, ha sido demostrado que la migración de las células endoteliales sembradas en la superficie hacia al interior del soporte poroso de colágeno disminuye al incrementar la concentración del colágeno (Cross et al. 2010). Sin embargo, no

se conoce la inclusión de este tipo de modelos en la evaluación *in vitro* de la respuesta de células endoteliales en monocapa a la presencia de LPS de periodontopatógenos

Inicialmente, en este estudio se hicieron varios modelos de cultivos 3D basados en soportes de colágeno tipo I. Estos fueron caracterizados y evaluados con el fin de escoger el más apropiado para el estudio propuesto. Cuando *ex vivo* las células se siembran sobre soportes o matrices de proteínas aisladas de la matriz extracelular, se busca que encuentren un sustrato que les permita funcionar en forma similar a como lo hacen en los tejidos a que pertenecen. Para ello, los soportes las deben señalar estructural, mecánica y molecularmente sin inducir una respuesta indeseada (Williams 2008). En un estado normal -anti-inflamatorio- el endotelio no expresa las citoquinas IL-8 e IL-6, factores solubles inducibles que promueven la adhesión y migración de leucocitos y monocitos en estados de injuria o inflamación de los tejidos (Lukacs et al. 1995; Arndt et al. 1996; Zohlnhofer et al. 2000). Por eso, el modelo escogido (3DCE) para evaluar la secreción de moléculas solubles y la transcripción de genes involucrados en función endotelial inducida por LPS de periodontopatógenos, fue el que mostró menor secreción basal de IL-8 e IL-6. Además, en este cultivo no se afectó la viabilidad celular y se formaron monocapas confluentes de HCAEC.

La resistencia transepitelial ha sido considerada como indicador de la integridad de epitelios y endotelios. En la medida en que un cultivo confluyente adquiere características de barrera de permeabilidad los valores TEER se vuelven estables (Cucullo et al. 2011). *In vivo* los valores TEER están estimados entre 1500 a 2000 ohm.cm² (Butt et al. 1990), mientras que *in vitro* monocapas de células endoteliales microvasculares de cerebro humano los valores son del orden de 20 a 200 ohm.cm² (Grant et al. 1998). En este trabajo los valores TEER de los cultivos 3D estuvieron en ese rango (\cong 120 ohm.cm²). Sin embargo, fueron inferiores a los valores TEER del cultivo 2DCE. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza tridimensional del soporte del colágeno y a que el soporte se retrajo, alejándose de la pared del inserto. Por eso, aunque sobre el soporte se formó una monocapa confluyente no se obtuvo una barrera de permeabilidad en la cara apical de los cultivos 3D. La identificación de PECAM-1 en las uniones célula-célula sugiere la conformación de una monocapa funcional, así esta no haya podido alcanzar las paredes del inserto. En previos estudios se ha demostrado

el papel de PECAM-1 en la adhesión célula-célula, célula-matriz, y migración de leucocitos al subendotelio (Park et al. 2010; Hashimoto et al. 2011; Privratsky and Newman 2014; Ren et al. 2015). Además, las células HCAEC sobre los soportes presentaron la morfología en adoquín característica de las células epiteliales y endoteliales. En el cultivo 3DCE también se identificaron VE-cadherina, marcador de uniones adherentes célula-célula en el endotelio, y factor Von Willebrand. La localización en la membrana celular de VE-cadherina confirma la formación de un endotelio confluyente a través de uniones estrechas célula-célula. La presencia de vWF cerca al núcleo y no en membrana, celular sugiere un fenotipo celular anti-trombótico (Rosnoblet et al. 2000; Ruggeri 2003; Dejana et al. 2008; Le Bihan et al. 2015; Dhanesha et al. 2016).

Las cepas W83 de *P. gingivalis* y 29522 de *A. actinomycetemcomitans* fueron la fuente de LPS, debido a que han mostrado ser más virulentas que otras cepas (Sundqvist et al. 1991; Laine and van Winkelhoff 1998; Shimada et al. 2008). El protocolo implementado de extracción, purificación y re-purificación permitió la obtención de LPSs con reducción de componentes contaminantes (Gualtero Escobar et al. 2014). El perfil electroforético de ambos purificados los clasifica como LPSs de tipo semirugoso, lo que indica que no presentan largas cadenas de polisacáridos en su estructura. Estos resultados coinciden con el quimiotipo semirugoso reportado para LPS purificados a partir de la cepa Y4 de *A. actinomycetemcomitans* (Masoud et al. 1991), pero no con el quimiotipo liso reportado para LPS purificados a partir de la cepa 33277 de *P. gingivalis* (Gualtero et al. 2008). Estos resultados indican variaciones estructurales en el antígeno O del LPS entre cepas de *P. gingivalis* pero no entre cepas de *A. actinomycetemcomitans*. Diferencias estructurales en el lípido A también han sido reportados para LPSs aislados de *P. gingivalis* alterando la respuesta celular inflamatoria inducida (Herath et al. 2013).

Como se mencionó, en los cultivos 2DCE y 3DCE se observaron diferencias en la respuesta a LPS-A.a y LPS-P.g. Por ejemplo, el LPS-A.a indujo expresiones altas de genes y moléculas marcadores de respuesta inflamatoria; mientras que el LPS-P.g indujo baja secreción de citoquinas, prostanoïdes y adhesión de monocitos. Ha sido reportado que hay diferencias estructurales del LPS de *P. gingivalis* que están relacionadas con diferencias en las vías de

activación y señalización celular que induce (Reife et al. 2006; Herath et al. 2013). Los LPSs de *P. gingivalis* son heterogéneos en la estructura del lípido A y poseen estructuras no clásicas penta-aciladas y tetra-aciladas. Por otro lado, los LPSs aislados de *A. actinomycetemcomitans* contienen un lípido A con estructuras hexa-aciladas similares a las del LPS de *Escherichia coli* (Masoud et al. 1991). Estas diferencias en composición y estructura pueden explicar la respuesta diferencial de los cultivos a LPS-P.g y LPS-A.a. La estructura heterogénea del LPS-P.g antagoniza a TLR4 y activa a las células a través de receptores TLR2 generando respuestas variables que dependen del tipo celular (L Kocgozlu et al. 2009). Sin embargo, estos resultados han sido controvertidos (Nativel et al. 2017). Por otro lado, ha sido demostrado que cultivos de células endoteliales humanas no presenta una respuesta pro-inflamatoria exacerbada (Honda et al. 2005) y presentan baja adhesión de monocitos (Roth et al. 2007) al ser expuestos a LPS de *P. gingivalis*. Lo anterior, sugiere la hipótesis de que un mecanismo de evasión de *P. gingivalis* puede ser que su LPS-P controle la expresión de marcadores proinflamatorios con el fin de mantener una inflamación crónica de bajo grado (Slocum et al. 2014). Los resultados de esta tesis parecen soportarla, ya que hubo marcadores proinflamatorios que no fueron inducidos o inducidos pobremente en los cultivos 2DCE y 3DCE.

Las células endoteliales mantienen la homeostasis endotelial mediante la producción de moléculas vasodilatadoras -PGI2- o vasoconstrictoras -TXB2- (Félétou et al. 2011). De hecho, los marcadores PGI2 y TXA2 se incrementan en pacientes con aterosclerosis (Belton et al. 2000). Mientras que PGI2 inhiben la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio, TXA2 induce la activación y adhesión de las plaquetas (FitzGerald et al. 1984). A pesar que no es clara la contribución de COX-2 en la síntesis de prostanoïdes durante procesos ateroscleróticos, un estudio en modelo animal demostró la función ateroprotectora de COX-2 (Kirkby et al. 2014). En los cultivos 2DCE tratados con LPS-A.a, la transcripción de COX-2 y la secreción de PGI2 y TXA2 incrementaron con relación a los cultivos no tratados. El mismo hallazgo fue hecho en cultivos de células HCAEC expuestos a LPS (Tan et al. 2007). Desafortunadamente, en la literatura revisada no hubo reportes sobre la transcripción del gen de la proteína COX-2 o de la secreción de PGI2 y TXA2 en cultivos tridimensionales tratados con LPS, que permitieran contrastar nuestros hallazgos.

El LPS de *P. gingivalis* induce la formación de placas ateroscleróticas en ratones; por otro lado, la inhibición de COX-2 incrementa el área lesionada (Gitlin and Loftin 2009). Estos resultados sugieren que COX-2 participa en la patogenia de la aterosclerosis. En esta tesis se encontró que en el modelo 3DCE, LPS-P.g y LPS-A.a inhiben la expresión de COX-2. Además, que LPS-A.a inhibe al factor anti-trombótico PGI-2 e incrementa el factor pro-trombótico TXA2. Estos datos sugieren que en el cultivo 3DCE desarrollado, se puede evaluar la disfunción endotelial inducida por periodontopatógenos.

El gen *eNOS* codifica la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS); la cual, cataliza la reacción que convierte L-arginina en L-citrulina y que resulta en la producción de óxido nítrico (NO). El NO producido por las células endoteliales activa la enzima guanilato ciclasa que inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos al endotelio y la relajación de la musculatura lisa del subendotelio (Gimbrone and García-Cardena 2016). Es por eso, que la disminución de la síntesis de NO endotelial se relaciona con disfunción endotelial y aterosclerosis (Kawashima and Yokoyama 2004). Por otro lado, el factor von Willebrand (vWF) es considerado marcador inflamatorio de disfunción endotelial porque activa la agregación plaquetaria cuando el endotelio se lesiona (Horvath et al. 2004; Kawecki et al. 2017). En este trabajo se encontraron diferencias significativas en la transcripción de los genes que codifican para las proteínas eNOS y vWF en los cultivos 3DCE, tratados y control. La disminución en la expresión de estos genes inducida por LPS-P.g y LPS-A., refuerza la idea de que el modelo 3DCE sirve para estudiar mecanismos de disfunción celular endotelial.

De las 40 citoquinas estudiadas, se detectaron 16 citoquinas en el medio de los cultivos 2DCE y 29 citoquinas en el medio de los cultivos 3DCE, lo cual, evidencia la influencia del sustrato sobre el que se siembran las células en el perfil secretorio de las monocapas de HCAEC. Este resultado debe tenerse en cuenta cuando se hacen estudios *in vitro*, ya que dependiendo del tipo de cultivo pueden presentarse variaciones en el perfil secretorio basal de las células endoteliales. Hay trabajos que reportan diferencias en factores proteicos secretados por

fibroblastos orales primarios (Espinosa et al. 2010); fibroblastos, células madre mesenquimales, células tumorales, entre otras (Asthana and Kisaalita 2016) en cultivos 2D y 3D, no se encontraron trabajos similares que evalúen células endoteliales.

En los cultivos 3DCE se expresaron 12 citoquinas que no fueron detectadas, o detectadas en menor concentración, en los cultivos 2DCE. Este hecho sugiere que las HCAEC cultivadas sobre los soportes de colágeno I adquieren un fenotipo celular diferente al de los cultivos 2DCE. En cultivos de células endoteliales tratados con LPSs y citoquinas (e.g.: IL-1 y TNF), se ha descrito una variación en el fenotipo mediada por TGF- β , TNF α , IL-1 β , IL-6 que se denomina activación tipo II. Resulta de la activación de factores de transcripción (e.g.: NF- κ B) que inducen la expresión de proteínas conocidas como antígenos de activación endotelial, entre los que se encuentran moléculas de adhesión leucocito-endotelio, factores procoagulantes, y quimoquinas de leucocitos (Smith et al. 1993). Esta variación del fenotipo celular está asociada con transiciones endotelio-mesénquima (EndTM, por sus siglas en inglés) (Echeverría et al. 2013; Echeverría et al. 2014; Pérez et al. 2017). El fenotipo EndTM de células endoteliales, ha sido asociado con disfunción endotelial y procesos ateroscleróticos (Chen et al. 2015; Evrard et al. 2016; Cho et al. 2018). En nuestro estudio se encontró que cuando los cultivos 3DCE son tratados con LPS-A.a, aumenta la secreción de TNF α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 y disminuyen las interacciones célula-célula. Lo anterior, sugiere que *in vitro* el LPS-A.a induce en las HCAEC un fenotipo similar al EndTM.

Las 12 citoquinas que se expresan diferencialmente en los cultivos 3DCE control, *in vivo* participan en procesos pro-ateroscleróticos importantes, entre ellos: respuesta inflamatoria (IL-10, IL-11 e IL-1 α) (Trepicchio et al. 1997; Kremlev and Palmer 2005; Gleissner et al. 2007; Auvin et al. 2010); estabilización de la placa aterosclerótica (IL-16) (Grönberg et al. 2015); remodelación vascular (PDGF-BB) (Qi et al. 2011); proliferación y migración de células endoteliales (TIMP-2) (Kim et al. 2014); reclutamiento de monocitos (TNF α , TNFR1, TNFR2, IL-7) (Venkatesh et al. 2013) y adhesión de NK a células endoteliales (IL-2) (Aronson et al. 1988). El hecho de que no se encuentren o se encuentren en menor concentración en los cultivos 2DCE, indica que el modelo 3DCE puede ser de mayor

utilidad en el estudio de procesos de disfunción endotelial relacionados con la atracción, adhesión y migración de células presentes en la aterosclerosis.

En el medio de los cultivos 2DCE y 3DCE tratados con LPS-P.g se cuantificaron 17 y 27 citoquinas, respectivamente. En el medio de los cultivos 2DCE y 3DCE tratados con LPS-A.a se cuantificaron 22 y 34 citoquinas, respectivamente. Estos resultados indican que hay diferencias en la respuesta de las células en función de la presencia del soporte de colágeno. También, que los patrones de secreción inducidos por cada uno de los lipopolisacáridos evaluados fueron diferentes.

En los cultivos 3DCE y 2DCE tratados con LPS-A.a la concentración de citoquinas asociadas con inflamación -IL-8, RANTES, IL-6, G-CSF e ICAM-1- (Gerszten et al. 1999; G. Liu et al. 2012; Venkatesh et al. 2013; Abadier et al. 2015; Chukkapalli et al. 2015), fue mayor que en los cultivos no tratados (control). Aunque este incremento se observó en los dos modelos, se presentaron diferencias en las concentraciones en función del sustrato sobre el que se sembraron las células.

A través de la metodología implementada en este estudio se pudo desarrollar y caracterizar un cultivo tridimensional de células endoteliales de arteria coronaria humana sobre soportes de colágeno I, como modelo *in vitro* para el estudio de la respuesta inflamatoria inducida por LPS de periodontopatógenos en un entorno más parecido al de los tejidos vasculares *in vivo*. El modelo 3DCE desarrollado es ventajoso para el estudio de la respuesta endotelial, debido a: i) se encuentran factores solubles que no se detectan o se detectan en menor concentración en los cultivos 2DCE; ii) se detectan fácilmente por microscopía marcadores celulares que evidencian la formación de monocapa confluyente; iii) se pueden tener periodos de experimentación más prolongados que en los cultivos 2DCE (en donde las células se desprenden una vez alcanzan confluencia), debido a que las células sobre los soportes de colágeno se mantienen vivas formando monocapa por más tiempo; iv) presencia de un componente (colágeno I) de la lámina reticular de la íntima sobre la cual la células endoteliales forman el endotelio vascular. Sin embargo, presenta la desventaja de que en su estado actual no cumple la función de barrera endotelial a pesar que se demostró la formación

de uniones adherentes célula-célula, la formación de monocapa y la confluencia de los cultivos. Lo anterior, obliga a diseñar nuevas estrategias de preparación de los soportes sobre los insertos que impidan su retracción y subsecuente separación de las paredes del inserto.

El modelo 3DCE debe completarse co-cultivando células musculares lisas que hacen parte del subendotelio, para obtener microambientes más parecidos a los que se encuentran en los vasos sanguíneos. Esto permitiría evaluar migración de leucocitos, modificación del soporte, proliferación celular y formación de células espumosa en el subendotelio, en condiciones de inflamación inducida por microorganismos periodontapatógenos. El modelo debe mejorarse considerando los aspectos hemodinámicos a las que se expone normalmente el endotelio, los cuales inducen en las células endoteliales tensiones mecánicas generadas por el fluido pulsátil de la sangre que modulan su fenotipo y comportamiento celular

7. CONCLUSIÓN

Se desarrolló y caracterizó un modelo celular tridimensional 3DCE para el estudio de la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacáridos de bacterias periodontopatógenas.

El modelo 3DCE sirve para evaluar mecanismos de patogenia inducidos por microorganismos periodontopatógenos que no pueden ser estudiados en los cultivos celulares convencionales.

El modelo 3DCE puede ser útil en la evaluación de nuevas terapias antiinflamatorias debido a que expresa basalmente 12 marcadores de inflamación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, Boscacci R, Vestweber D, Barnum S, Deutsch U, Engelhardt B, Lyck R. 2015. Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur. J. Immunol.* 45:1043–1058. [accessed 2018 Apr 17].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545837>
- Abdi K, Chen T, Klein BA, Tai AK, Coursen J, Liu X, Skinner J, Periasamy S, Choi Y, Kessler BM, et al. 2017. Mechanisms by which *Porphyromonas gingivalis* evades innate immunity. Amar S, editor. *PLoS One* 12:e0182164. [accessed 2018 Mar 28].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28771533>
- Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, Hyun JK. 2013. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65:429–456. [accessed 2018 Apr 9]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960357>
- Alekseeva T, Unger RE, Brochhausen C, Brown RA, Kirkpatrick JC. 2014a. Engineering a microvascular capillary bed in a tissue-like collagen construct. *Tissue Eng. Part A* 20:2656–65. [accessed 2018 Feb 16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24684395>
- Alekseeva T, Unger RE, Brochhausen C, Brown RA, Kirkpatrick JC. 2014b. Engineering a microvascular capillary bed in a tissue-like collagen construct. *Tissue Eng. Part A* 20:2656–65. [accessed 2018 Apr 9]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24684395>
- Alexander I, Edelman ER, Methe H. 2009. Function and mode of regulation of endothelial major histocompatibility complex class II. *Cell Transplant.* 18:255–259.
- Anglemyer AT, Krauth D, Bero L. 2015. Industry sponsorship and publication bias among animal studies evaluating the effects of statins on atherosclerosis and bone outcomes: a meta-analysis. *BMC Med. Res. Methodol.* 15:12. [accessed 2018 Apr 24].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880564>
- Arndt H, Bolanowski MA, Granger DN. 1996. Role of interleukin 8 on leucocyte-endothelial cell adhesion in intestinal inflammation. *Gut* 38:911–915.
- Aronson FR, Libby P, Brandon EP, Janicka MW, Mier JW. 1988. IL-2 rapidly induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J. Immunol.* 141:158–63. [accessed 2018 Apr 17].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3259966>
- Ashe HL, Briscoe J. 2006. The interpretation of morphogen gradients. *Development* 133:385–394. [accessed 2018 Apr 1]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410409>
- Asthana A, Kisaalita WS. 2016. Molecular basis for cytokine biomarkers of complex 3D microtissue physiology in vitro. *Drug Discov. Today* 21:950–61. [accessed 2018 May 16].
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644616300800>
- Auvin S, Shin D, Mazarati A, Sankar R. 2010. Inflammation induced by LPS enhances epileptogenesis in immature rat and may be partially reversed by IL1RA. *Epilepsia* 51:34–38. [accessed 2018 Apr 17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618397>
- Baker BM, Chen CS. 2012. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* 125:3015–24. [accessed 2017 Mar 28].
<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.079509>
- Bartova J, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Mysak J, Prochazkova J, Duszkova J, Janatova T, Podzimek S. 2014. Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J. Immunol. Res.* 2014.

- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. 2000. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840–5. [accessed 2018 Feb 15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952950>
- Benton G, George J, Kleinman HK, Arnaoutova IP. 2009. Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J. Cell. Physiol.* 221:18–25. [accessed 2018 May 3]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19492404>
- Le Bihan O, Decossas M, Gontier E, Gerbod-Giannone M-C, Lambert O. 2015. Visualization of adherent cell monolayers by cryo-electron microscopy: A snapshot of endothelial adherens junctions. *J. Struct. Biol.* 192:470–477. [accessed 2018 May 13]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104784771530085X>
- Boccafoschi F, Habermehl J, Vesentini S, Mantovani D. 2005. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 26:7410–7417.
- Brodala N, Merricks EP, Bellinger DA, Damrongsri D, Offenbacher S, Beck J, Madianos P, Sotres D, Chang Y-L, Koch G, et al. 2005. Porphyromonas gingivalis bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:1446–51. [accessed 2017 Mar 27]. <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000167525.69400.9c>
- Brown RA, Wiseman M, Chuo C-B, Cheema U, Nazhat SN. 2005. Ultrarapid Engineering of Biomimetic Materials and Tissues: Fabrication of Nano- and Microstructures by Plastic Compression. *Adv. Funct. Mater.* 15:1762–1770. [accessed 2018 Apr 9]. <http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.200500042>
- Bugueno IM, Khelif Y, Seelam N, Morand D-N, Tenenbaum H, Davideau J-L, Huck O. 2016. Porphyromonas gingivalis Differentially Modulates Cell Death Profile in Ox-LDL and TNF- α Pre-Treated Endothelial Cells. *PLoS One* 11:e0154590.
- Bustos RH, Suesca E, Millán D, González JM, Fontanilla MR. 2014. Real-time quantification of proteins secreted by artificial connective tissue made from uni- or multidirectional collagen I scaffolds and oral mucosa fibroblasts. *Anal. Chem.* 86:2421–8. [accessed 2017 Mar 9]. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac4033164>
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol.* 429:47–62.
- Campillo-Fernández AJ, Unger RE, Peters K, Halstenberg S, Santos M, Sánchez MS, Dueñas JMM, Pradas MM, Ribelles JLG, Kirkpatrick CJ. 2009. Analysis of the Biological Response of Endothelial and Fibroblast Cells Cultured on Synthetic Scaffolds with Various Hydrophilic/Hydrophobic Ratios: Influence of Fibronectin Adsorption and Conformation. *Tissue Eng. Part A* 15:1331–1341. [accessed 2018 Apr 9]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976156>
- Carrel A, Burrows MT. 1911. CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO AND ITS TECHNIQUE. *J. Exp. Med.* 13:387–96. [accessed 2018 Mar 31]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867420>
- Castillo DM, Sanchez-Beltran MC, Castellanos JE, Sanz I, Mayorga-Fayad I, Sanz M, Lafaurie GI. 2011. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J. Clin. Periodontol.* 38:418–427.
- Chen P-Y, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M. 2015. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J. Clin. Invest.* 125:4514–28. [accessed 2018 Apr 23]. <https://www.jci.org/articles/view/82719>

- Cho JG, Lee A, Chang W, Lee M-S, Kim J. 2018. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Front. Immunol.* 9:294. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29515588>
- Choi B-J, Matsuo Y, Aoki T, Kwon T-G, Prasad A, Gulati R, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. 2014. Coronary Endothelial Dysfunction Is Associated With Inflammation and Vasa Vasorum Proliferation in Patients With Early Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:2473–2477. [accessed 2018 Apr 24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234815>
- Chukkapalli SS, Velsko IM, Rivera-Kweh MF, Zheng D, Lucas AR, Kesavalu L. 2015. Polymicrobial Oral Infection with Four Periodontal Bacteria Orchestrates a Distinct Inflammatory Response and Atherosclerosis in ApoE null Mice. Amar S, editor. *PLoS One* 10:e0143291. [accessed 2017 May 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26619277>
- Cross VL, Zheng Y, Won Choi N, Verbridge SS, Sutermaster BA, Bonassar LJ, Fischbach C, Stroock AD. 2010. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis in vitro. *Biomaterials* 31:8596–607. [accessed 2018 May 14]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210009440>
- Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D. 2011. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci.* 12:40.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* 121:2115–22. [accessed 2017 Mar 22]. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.017897>
- DelNero P, Lane M, Verbridge SS, Kwee B, Kermani P, Hempstead B, Stroock A, Fischbach C. 2015. 3D culture broadly regulates tumor cell hypoxia response and angiogenesis via pro-inflammatory pathways. *Biomaterials* 55:110–8. [accessed 2017 Mar 14]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215003130>
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR, Sacco RL, Papapanou PN. 2005. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation* 111:576–82. [accessed 2017 Mar 27]. <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000154582.37101.15>
- Dhanesha N, Prakash P, Doddapattar P, Khanna I, Pollpeter MJ, Nayak MK, Staber JM, Chauhan AK. 2016. Endothelial Cell-Derived von Willebrand Factor Is the Major Determinant That Mediates von Willebrand Factor-Dependent Acute Ischemic Stroke by Promoting Postischemic Thrombo-Inflammation Highlights. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36:1829–1837. [accessed 2018 May 1]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444201>
- Dietrich T, Jimenez M, Krall Kaye EA, Vokonas PS, Garcia RI. 2008. Age-dependent associations between chronic periodontitis/edentulism and risk of coronary heart disease. *Circulation* 117:1668–74. [accessed 2017 Mar 24]. <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.711507>
- Dixon DR, Darveau RP. 2005. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J. Dent. Res.* 84:584–595.
- Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. 2017. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 32:266–277. [accessed 2018 Mar 2]. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00036.2016>

- Echeverría C, Montorfano I, Sarmiento D, Becerra A, Nuñez-Villena F, Figueroa XF, Cabello-Verrugio C, Elorza AA, Riedel C, Simon F. 2013. Lipopolysaccharide induces a fibrotic-like phenotype in endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 17:800–814. [accessed 2018 Apr 25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635013>
- Echeverría C, Montorfano I, Tapia P, Riedel C, Cabello-Verrugio C, Simon F. 2014. Endotoxin-Induced Endothelial Fibrosis Is Dependent on Expression of Transforming Growth Factors β 1 and β 2. Blanke SR, editor. *Infect. Immun.* 82:3678–3686. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935972>
- Egan KM, Wang M, Fries S, Lucitt MB, Zukas AM, Puré E, Lawson JA, FitzGerald GA. 2005. Cyclooxygenases, Thromboxane, and Atherosclerosis: Plaque Destabilization by Cyclooxygenase-2 Inhibition Combined With Thromboxane Receptor Antagonism. *Circulation* 111:334–342. [accessed 2018 Mar 30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655126>
- Erridge C, Spickett CM, Webb DJ. 2007. Non-enterobacterial endotoxins stimulate human coronary artery but not venous endothelial cell activation via Toll-like receptor 2. *Cardiovasc. Res.* 73:181–189.
- Espinosa, Lady, Sosnik A, Fontanilla MR. 2010. Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. *Tissue Eng. Part A* 16:1667–79. [accessed 2017 Jun 12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001832>
- Evans MJ, Fanucchi M V., Plopper CG, Hyde DM. 2010. Postnatal Development of the Lamina Reticularis in Primate Airways. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 293:947–954. [accessed 2018 May 3]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503389>
- Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, Nomura-Kitabayashi A, Pandey G, Purushothaman K-R, d'Escamard V, Li JR, Hadri L, Fujitani K, et al. 2016. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat. Commun.* 7:11853. [accessed 2018 Apr 25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340017>
- Fardini Y, Wang X, Témoïn S, Nithianantham S, Lee D, Shoham M, Han YW. 2011. Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Mol. Microbiol.* 82:1468–80. [accessed 2017 Mar 27]. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x>
- Félétou M. 2011. The Endothelium. Morgan & Claypool Life Sciences. [accessed 2018 Mar 29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850763>
- Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. 2011. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* 164:894–912. [accessed 2018 May 3]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323907>
- FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR. 1984. Increased Prostacyclin Biosynthesis in Patients with Severe Atherosclerosis and Platelet Activation. *N. Engl. J. Med.* 310:1065–1068. [accessed 2018 Feb 15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6231483>
- Fontanilla MR, Espinosa LG. 2012. In vitro and in vivo assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft. *Tissue Eng. Part A* 18:1857–66. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559831>
- Gautier-Veyret E, Van Noolen L, Lévy P, Pepin JL, Stanke-Labesque F. 2015. Could the thromboxane A2 pathway be a therapeutic target for the treatment of obstructive sleep

- apnea-induced atherosclerosis? Prostaglandins Other Lipid Mediat. 121:97–104. [accessed 2018 Mar 30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026712>
- Geerts SO, Nys M, De MP, Charpentier J, Albert A, Legrand V, Rompen EH. 2002. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *J. Periodontol.* 73:73–8. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2002.73.1.73>
- Genco RJ, Van Dyke TE. 2010. Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat. Rev.* 7:479–480.
- George EL, Baldwin HS, Hynes RO. 1997. Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* 90:3073–81. [accessed 2018 Apr 28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9376588>
- Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone Jr MA, Luster AD, Lusinskas FW, Rosenzweig A. 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398:718–723.
- Gibson FC, Hong C, Chou H-H, Yumoto H, Chen J, Lien E, Wong J, Genco CA. 2004. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109:2801–6. [accessed 2018 Apr 24]. <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000129769.17895.F0>
- Gimbrone MA. 2010. The Gordon Wilson lecture. Understanding vascular endothelium: a pilgrim's progress. Endothelial dysfunction, biomechanical forces and the pathobiology of atherosclerosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 121:115–27; discussion 127. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697555>
- Gimbrone MA, García-Cardeña G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118:620–636. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892962>
- Gitlin JM, Loftin CD. 2009. Cyclooxygenase-2 inhibition increases lipopolysaccharide-induced atherosclerosis in mice. *Cardiovasc. Res.* 81:400–7. [accessed 2018 Feb 15]. <https://academic.oup.com/circovasres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvn286>
- Gleissner CA, Zastrow A, Klingenberg R, Kluger MS, Konstantin M, Celik S, Haemmerling S, Shankar V, Giese T, Katus HA, et al. 2007. IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 37:177–92. [accessed 2018 Apr 17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163451>
- Gonzalez DM, Medici D. 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 7:re8-re8. [accessed 2018 Apr 25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249658>
- Grant DS, Kleinman HK, Martin GR. 1990. The role of basement membranes in vascular development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 588:61–72. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2192650>
- Grant GA, Abbott NJ, Janigro D. 1998. Understanding the Physiology of the Blood-Brain Barrier: In Vitro Models. *News Physiol. Sci. an Int. J. Physiol. Prod.* jointly by Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc. 13:287–293.
- Griffith LG, Swartz MA. 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:211–224. [accessed 2017 Aug 11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496023>
- Grönberg C, Bengtsson E, Fredrikson GN, Nitulescu M, Ascitto G, Persson A, Andersson L, Nilsson J, Gonçalves I, Björkbacka H. 2015. Human Carotid Plaques With High Levels

- of Interleukin-16 Are Associated With Reduced Risk for Cardiovascular Events. *Stroke* 46:2748–54. [accessed 2017 May 10].
<http://stroke.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/STROKEAHA.115.009910>
- Gu L, Meng R, Tang Y, Zhao K, Liang F, Zhang R, Xue Q, Chen F, Xiao X, Wang H, et al. 2018 Feb 16. Toll Like Receptor 4 Signaling Licenses the Cytosolic Transport of Lipopolysaccharide from Bacterial Outer Membrane Vesicles. *SHOCK*:1. [accessed 2018 Mar 28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29462003>
- Gualtero D, Castellanos J, Perez G, Lafaurie G. 2008. PURIFICACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO DE *Porphyromonas gingivalis* LIBRE DE POLISACÁRIDOS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN SEPHACRYL S-200. *Acta Biológica Colomb.* 13:148–160. [accessed 2018 May 14].
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/17451>
- Gualtero DF, Lafaurie GI, Fontanilla MR. 2018. Two-dimensional and three-dimensional models for studying atherosclerosis pathogenesis induced by periodontopathogenic microorganisms. *Mol. Oral Microbiol.* 33.
- Gualtero DF, Viafara-Garcia SM, Morantes SJ, Buitrago DM, Gonzalez OA, Lafaurie GI. 2017. Rosuvastatin Inhibits Interleukin (IL)-8 and IL-6 Production in Human Coronary Artery Endothelial Cells Stimulated With *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Serotype b. *J. Periodontol.* 88:225–235. [accessed 2017 Jun 21].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27739345>
- Gualtero Escobar DF, Porras Gaviria JP, Bernau Gutierrez S, Buitrago Ramírez DM, Castillo Perdomo DM, Lafaurie Villamil GI. 2014. Purificación y caracterización de lipopolisacáridos de *Eikenella corrodens* 23834 y *Porphyromonas gingivalis* W83 . *Rev. Colomb. Biotecnol.* 16:34–44.
- Hama S, Takeichi O, Fujisaki K, Tanabe N, Maeno M, Ochiai K. 2008. Nitric oxide attenuates vascular endothelial cadherin-mediated vascular integrity in human chronic inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 154:384–390. [accessed 2017 Mar 10].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19037921>
- Harokopakis E, Albrecht MH, Martin MH, Hajishengallis G. 2006. TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Immunol.* 176:7645–56. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751412>
- Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Hagihara K, Hatano M, Okamoto T, Kanouchi H, Minatogawa Y, Mohri S, Tsujioka K, et al. 2011. Monocyte trans-endothelial migration augments subsequent transmigratory activity with increased PECAM-1 and decreased VE-cadherin at endothelial junctions. *Int. J. Cardiol.* 149:232–9. [accessed 2018 May 1].
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527310010594>
- Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M. 2011. *Porphyromonas gingivalis* stimulates monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62:57–65.
- Heino J, Käpylä J. 2009. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr. Pharm. Des.* 15:1309–17. [accessed 2018 Apr 1]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19355970>
- Helary C, Bataille I, Abed A, Illoul C, Anglo A, Louedec L, Letourneur D, Meddahi-Pellé A, Giraud-Guille MM. 2010. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. *Biomaterials* 31:481–490. [accessed 2018 Apr 9].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19811818>
- Herath TD, Darveau RP, Seneviratne CJ, Wang CY, Wang Y, Jin L. 2013. Tetra- and

- penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF-kappaB signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS One* 8:e58496.
- Hess S, Methe H, Kim J-O, Edelman ER. 2009. NF-kappaB activity in endothelial cells is modulated by cell substratum interactions and influences chemokine-mediated adhesion of natural killer cells. *Cell Transplant.* 18:261–273.
- Heying R, Wolf C, Beekhuizen H, Moelleken M-L, Jockenhoevel S, Hoylaerts MF, Schmidt KG, Schrotten H. 2012. Fibrin- and Collagen-Based Matrices Attenuate Inflammatory and Procoagulant Responses in Human Endothelial Cell Cultures Exposed to *Staphylococcus aureus*. *Tissue Eng. Part A* 18:147–156. [accessed 2017 Mar 14]. <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2011.0029>
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 165:618–622.
- Ho M-H, Guo Z-M, Chunga J, Goodwin JS, Xie H. 2016. Characterization of Innate Immune Responses of Human Endothelial Cells Induced by *Porphyromonas gingivalis* and Their Derived Outer Membrane Vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:139. [accessed 2017 Mar 24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826542>
- Holtfreter B, Empen K, Glaser S, Lorbeer R, Volzke H, Ewert R, Kocher T, Dorr M. 2013. Periodontitis is associated with endothelial dysfunction in a general population: a cross-sectional study. *PLoS One* 8:e84603.
- Honda T, Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. 2005. Effects of *Porphyromonas gingivalis* antigens and proinflammatory cytokines on human coronary artery endothelial cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 20:82–8. [accessed 2017 May 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720567>
- Horvath B, Hegedus D, Szapary L, Marton Z, Alexy T, Koltai K, Czopf L, Wittmann I, Juricskay I, Toth K, et al. 2004. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. *Exp. Clin. Cardiol.* 9:31–4. [accessed 2018 May 22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641694>
- Htwe SS, Harrington H, Knox A, Rose F, Aylott J, Haycock JW, Ghaemmaghami AM. 2015. Investigating NF-κB signaling in lung fibroblasts in 2D and 3D culture systems. *Respir. Res.* 16:144. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26619903>
- Huang NF, Okogbaa J, Lee JC, Jha A, Zaitseva TS, Paukshto M V, Sun JS, Punjya N, Fuller GG, Cooke JP. 2013. The modulation of endothelial cell morphology, function, and survival using anisotropic nanofibrillar collagen scaffolds. *Biomaterials* 34:4038–4047.
- Ichimura T, Hashimoto PH. 1984. Fine structure of basement membranes of the capillary endothelium and perivascular astrocyte in some circumventricular organs by three-dimensional SEM. *J. Ultrastruct. Res.* 86:220–7. [accessed 2018 May 4]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6544860>
- Indolfi L, Baker AB, Edelman ER. 2012. The role of scaffold microarchitecture in engineering endothelial cell immunomodulation. *Biomaterials* 33:7019–7027.
- Isoda T, Tsutsumi T, Yamazaki K, Nishihara T. 2009. Measurement of plaque-forming macrophages activated by lipopolysaccharide in a micro-channel chip. *J. Periodontal Res.* 44:609–15. [accessed 2017 Mar 27]. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0765.2008.01167.x>
- James Kirkpatrick C, Fuchs S, Iris Hermanns M, Peters K, Unger RE. 2007. Cell culture

- models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28:5193–5198. [accessed 2018 Apr 9]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761278>
- Jia R, Kurita-Ochiai T, Oguchi S, Yamamoto M. 2013. Periodontal pathogen accelerates lipid peroxidation and atherosclerosis. *J. Dent. Res.* 92:247–252.
- Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M. 2010. Three-dimensional constructs induce high cellular activity: Structural stability and the specific production of proteins and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402:153–7. [accessed 2017 Mar 14]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10018589>
- Kawashima S, Yokoyama M. 2004. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:998–1005. [accessed 2018 Feb 15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001455>
- Kawecki C, Lenting PJ, Denis C V. 2017. von Willebrand factor and inflammation. *J. Thromb. Haemost.* 15:1285–1294. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28671350>
- Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. 2010. “Gum bug, leave my heart alone!”--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J. Dent. Res.* 89:879–902.
- Kim H-J, Cho Y-R, Kim SH, Seo D-W. 2014. TIMP-2-derived 18-mer peptide inhibits endothelial cell proliferation and migration through cAMP/PKA-dependent mechanism. *Cancer Lett.* 343:210–216. [accessed 2018 Apr 17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252252>
- Kim SA, Tai C-Y, Mok L-P, Mosser EA, Schuman EM. 2011. Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:9857–9862. [accessed 2018 May 8]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613566>
- Kirkby NS, Lundberg MH, Wright WR, Warner TD, Paul-Clark MJ, Mitchell JA. 2014. COX-2 Protects against Atherosclerosis Independently of Local Vascular Prostacyclin: Identification of COX-2 Associated Pathways Implicate Rgl1 and Lymphocyte Networks. Wallace J, editor. *PLoS One* 9:e98165. [accessed 2018 Feb 15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24887395>
- Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K. 2003. *Porphyromonas gingivalis* Modulates the Production of Interleukin 8 and Monocyte Chemotactic Protein 1 in Human Vascular Endothelial Cells. *Curr. Microbiol.* 46:109–114. [accessed 2017 Mar 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12520365>
- Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. 2009. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J. Dent. Res.* 88:741–745.
- Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. 2009. Variable Cell Responses to *P. gingivalis* Lipopolysaccharide. *J. Dent. Res.* 88:741–745. [accessed 2017 Mar 14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734462>
- Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB. 2017. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ. Res.* 120:179–206. [accessed 2018 Mar 29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057793>
- Kozarov E V, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA (Jr), Progulsk-Fox A. 2005. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:e17-8.
- Kramer CD, Simas AM, He X, Ingalls RR, Weinberg EO, Genco CA. 2017. Distinct roles for dietary lipids and *Porphyromonas gingivalis* infection on atherosclerosis progression and the gut microbiota. *Anaerobe* 45:19–30. [accessed 2018 Apr 24].

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28442421>
Kreimendahl F, Köpf M, Thiebes AL, Duarte Campos DF, Blaeser A, Schmitz-Rode T, Apel C, Jockenhoevel S, Fischer H. 2017. Three-Dimensional Printing and Angiogenesis: Tailored Agarose-Type I Collagen Blends Comprise Three-Dimensional Printability and Angiogenesis Potential for Tissue-Engineered Substitutes. *Tissue Eng. Part C. Methods* 23:604–615. [accessed 2018 May 3]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28826357>
- Kremlev SG, Palmer C. 2005. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J. Neuroimmunol.* 162:71–80. [accessed 2018 Apr 17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833361>
- Krenning G, Moonen J-RAJ, van Luyn MJA, Harmsen MC. 2008. Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EnMT) on collagen matrices. *Biomaterials* 29:3703–3711. [accessed 2018 Apr 25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18556062>
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.* 107:1589–98. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049626>
- Kular JK, Basu S, Sharma RI. 2014. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* 5:2041731414557112. [accessed 2017 Aug 11]. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731414557112>
- Kurita-Ochiai T, Yamamoto M. 2014. Periodontal pathogens and atherosclerosis: implications of inflammation and oxidative modification of LDL. *Biomed Res. Int.:*595981.
- Kutys ML, Chen CS. 2016. Forces and mechanotransduction in 3D vascular biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 42:73–79. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27209346>
- Lafaurie GI, Mayorga-Fayad I, Torres MF, Castillo DM, Aya MR, Barón A, Hurtado PA. 2007. Periodontopathic microorganisms in peripheric blood after scaling and root planing. *J. Clin. Periodontol.* 34.
- Laine ML, van Winkelhoff AJ. 1998. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol. Immunol.* 13:322–5. [accessed 2018 May 14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807125>
- Lakio L, Lehto M, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Malle E, Asikainen S, Pussinen PJ. 2006. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Endotoxin Res.* 12:57–64.
- Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, Lu Y, Papapanou PN, Schmidt AM. 2003. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:1405–11. [accessed 2018 Apr 24]. <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000082462.26258.FE>
- Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Marchisio PC. 1991. The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J. Cell Biol.* 112:479–90. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1899416>
- Lee CH, Tsai CM. 1999. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Anal. Biochem.* 267:161–168.
- Lei L, Li H, Yan F, Li Y, Xiao Y. 2011. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide

- alters atherosclerotic-related gene expression in oxidized low-density-lipoprotein-induced macrophages and foam cells. *J. Periodontal Res.* 46:427–437.
- Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. 1987. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:136–40. [accessed 2018 Mar 29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3467345>
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868–874.
- Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. 2013. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity* 38:1092–1104.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473:317–325.
- Liu B, Cheng L, Liu D, Wang J, Zhang X, Shu R, Liang J. 2012. Role of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced VCAM-1 expression in human aortic endothelial cells. *J. Periodontol.* 83:955–962.
- Liu F, Wang Y, Xu J, Liu F, Hu R, Deng H. 2016. Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the expression of key genes involved in cholesterol metabolism in macrophages. *Arch. Med. Sci.* 5:959–967. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695485>
- Liu G, Place AT, Chen Z, Brovkovich VM, Vogel SM, Muller WA, Skidgel RA, Malik AB, Minshall RD. 2012. ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration. *Blood* 120:1942–1952.
- Lukacs NW, Strieter RM, Elner V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL. 1995. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86:2767–2773.
- Macleod M. 2011. Why animal research needs to improve. *Nature* 477:511–511. [accessed 2018 Apr 24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956292>
- Maekawa T, Takahashi N, Honda T, Yonezawa D, Miyashita H, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. 2010. *Porphyromonas gingivalis* antigens and interleukin-6 stimulate the production of monocyte chemoattractant protein-1 via the upregulation of early growth response-1 transcription in human coronary artery endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 47:346–54. [accessed 2018 Apr 24]. <https://www.karger.com/Article/FullText/265568>
- Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, Miyauchi S, Miyazawa H, Nakajima T, Yamazaki K. 2011. Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One* 6:e20240.
- Mahalakshmi K, Krishnan P, Krishna Baba MG, Dhivyapriya V, Arumugam SB. 2017. “Association of periodontopathic anaerobic bacterial co-occurrence to atherosclerosis” – A cross-sectional study. *Anaerobe* 44:66–72. [accessed 2017 Mar 8]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28189829>
- von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267:531–2. [accessed 2018 Mar 31]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/559947>
- Masoud H, Weintraub ST, Wang R, Cotter R, Holt SC. 1991. Investigation of the structure of lipid A from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 and human clinical isolate PO 1021-7. *Eur. J. Biochem.* 200:775–781.
- Mateos-Timoneda MA, Levato R, Punet X, Cano I, Castano O, Engel E. 2015. Biofunctionalization of polymeric surfaces. In: 2015 37th Annual International Conference

- of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). Vol. 2015. IEEE. p. 1745–1748. [accessed 2018 Apr 9]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26736615>
- Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ. 1976. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:1674–8. [accessed 2018 Mar 31]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1064040>
- Mehta D, Malik AB. 2006. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol. Rev.* 86:279–367. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371600>
- Methe H, Edelman ER. 2006. Tissue Engineering of Endothelial Cells and the Immune Response. *Transplant. Proc.* 38:3293–3299. [accessed 2017 Mar 28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17175253>
- Methe H, Hess S, Edelman ER. 2007. Endothelial immunogenicity--a matter of matrix microarchitecture. *Thromb. Haemost.* 98:278–282.
- Methe H, Hess S, Edelman ER. 2008. The effect of three-dimensional matrix-embedding of endothelial cells on the humoral and cellular immune response. *Semin. Immunol.* 20:117–22. [accessed 2016 Jan 26]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532307001170>
- Morishita M, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. 2013. A. actinomycetemcomitans LPS Enhances Foam Cell Formation Induced by LDL. *J. Dent. Res.* 92:241–246. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318766>
- Mougeot J-LC, Stevens CB, Paster BJ, Brennan MT, Lockhart PB, Mougeot FKB. 2017. *Porphyromonas gingivalis* is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. *J. Oral Microbiol.* 9:1281562. [accessed 2017 Mar 24]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20002297.2017.1281562>
- Murikipudi S, Methe H, Edelman ER. 2013. The effect of substrate modulus on the growth and function of matrix-embedded endothelial cells. *Biomaterials* 34:677–84. [accessed 2017 Mar 28]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212011027>
- Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. 2007. Markers of Systemic Bacterial Exposure in Periodontal Disease and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Periodontol.* 78:2289–2302. [accessed 2017 Mar 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18052701>
- Nakamura N, Yoshida M, Umeda M, Huang Y, Kitajima S, Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T. 2008. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis* 196:59–67. [accessed 2017 Mar 27]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915007000986>
- Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. 2008. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol. Immunol.* 23:170–172.
- Nativel B, Couret D, Giraud P, Meilhac O, d’Hellencourt CL, Viranaïcken W, Da Silva CR. 2017. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human. *Sci. Rep.* 7:15789. [accessed 2018 Feb 16]. <http://www.nature.com/articles/s41598-017-16190-y>
- Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, Bowman ML, Liszewski MK, Lu L, Quan Y, Balgobin S, Schneppenheim R, Schneppenheim S, et al. 2016. Von Willebrand factor regulates

- complement on endothelial cells. *Kidney Int.* 90:123–134. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27236750>
- Orr AW, Sanders JM, Bevard M, Coleman E, Sarembock IJ, Schwartz MA. 2005. The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow. *J. Cell Biol.* 169:191–202. [accessed 2017 Mar 27]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809308>
- Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonzalez C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C. 2006. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.* 41:350–353.
- Panduawala CP, Zhan X, Dissanayaka WL, Samaranyake LP, Jin L, Zhang C. 2017. *In vivo* periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. *J. Periodontal Res.* 52:408–418. [accessed 2017 Apr 24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27495271>
- Park S, DiMaio TA, Scheef EA, Sorenson CM, Sheibani N. 2010. PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299:C1468-84. [accessed 2018 May 13]. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00246.2010>
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, et al. 2011. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 12:2825–2830. [accessed 2018 May 4]. <http://www.jmlr.org/papers/v12/pedregosa11a.html>
- Pérez L, Muñoz-Durango N, Riedel CA, Echeverría C, Kalergis AM, Cabello-Verrugio C, Simon F. 2017. Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 33:41–54. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27692608>
- Peters K, Unger RE, Stumpf S, Schäfer J, Tsaryk R, Hoffmann B, Eisenbarth E, Breme J, Ziegler G, Kirkpatrick CJ. 2008. Cell type-specific aspects in biocompatibility testing: the intercellular contact in vitro as an indicator for endothelial cell compatibility. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19:1637–1644. [accessed 2018 May 3]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914634>
- Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. 2005. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials* 26:5658–5667. [accessed 2017 Aug 22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878371>
- Prasad CK, Krishnan LK. 2008. Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater.* 4:182–191. [accessed 2018 Feb 15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643359>
- Privratsky JR, Newman PJ. 2014. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res.*
- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. 2001. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J. Immunol.* 167:5067–76. [accessed 2018 Mar 28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673516>
- Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J, Salomaa V. 2007. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:1433–1439.
- Qi M, Miyakawa H, Kuramitsu HK. 2003. *Porphyromonas gingivalis* induces murine

- macrophage foam cell formation. *Microb. Pathog.* 35:259–267.
- Qi Y-X, Jiang J, Jiang X-H, Wang X-D, Ji S-Y, Han Y, Long D-K, Shen B-R, Yan Z-Q, Chien S, et al. 2011. PDGF-BB and TGF- β 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:1908–1913. [accessed 2017 May 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245329>
- Regier MC, Montanez-Sauri SI, Schwartz MP, Murphy WL, Beebe DJ, Sung KE. 2017. The Influence of Biomaterials on Cytokine Production in 3D Cultures. *Biomacromolecules* 18:709–718. [accessed 2018 Mar 26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28157290>
- Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, Howald WN, Darveau RP. 2006. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell. Microbiol.* 8:857–868.
- Ren Q, Ren L, Ren C, Liu X, Dong C, Zhang X. 2015. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) plays a critical role in the maintenance of human vascular endothelial barrier function. *Cell Biochem. Funct.* 33:560–5. [accessed 2017 Mar 22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607202>
- Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldá S, Progulske-Fox A. 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J. Periodontol.* 84:S30-50.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217–25. [accessed 2018 Mar 28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119492>
- Rodrigues PH, Reyes L, Chadda AS, Bélanger M, Wallet SM, Akin D, Dunn W, Progulske-Fox A. 2012. Porphyromonas gingivalis Strain Specific Interactions with Human Coronary Artery Endothelial Cells: A Comparative Study. Gadeau A-P, editor. *PLoS One* 7:e52606. [accessed 2017 Mar 10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300720>
- Rosnoble C, Ribba AS, Wollheim CB, Kruithof EK, Vischer UM. 2000. Regulated von Willebrand factor (vWf) secretion is restored by pro-vWf expression in a transfectable endothelial cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1495:112–9. [accessed 2018 May 1]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634936>
- Roth GA, Moser B, Roth-Walter F, Giacona MB, Harja E, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. 2007. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 190:271–281.
- Ruggeri ZM. 2003. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost.* 1:1335–42. [accessed 2018 Apr 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871266>
- Shimada T, Sugano N, Nishihara R, Suzuki K, Tanaka H, Ito K. 2008. Differential effects of five Aggregatibacter actinomycetemcomitans strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 23:455–458.
- Slocum C, Coats SR, Hua N, Kramer C, Papadopoulos G, Weinberg EO, Gudino C V, Hamilton JA, Darveau RP, Genco CA. 2014. Distinct lipid a moieties contribute to pathogen-induced site-specific vascular inflammation. *PLoS Pathog.* 10:e1004215.
- Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA. 1993. Chemotactic desensitization of neutrophils demonstrates interleukin-8 (IL-8)-dependent and IL-8-independent mechanisms of transmigration through cytokine-activated endothelium. *Immunology* 78:491–7. [accessed 2018 May 23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478031>
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RLJ. 1998. Microbial complexes

- in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25:134–144.
- Stratman AN, Davis GE. 2012. Endothelial Cell-Pericyte Interactions Stimulate Basement Membrane Matrix Assembly: Influence on Vascular Tube Remodeling, Maturation, and Stabilization. *Microsc. Microanal.* 18:68–80. [accessed 2018 Mar 29].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166617>
- Suesca E, Dias AMA, Braga MEM, de Sousa HC, Fontanilla MR. 2017. Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 77:333–341. [accessed 2017 Jun 12].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28532037>
- Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. 2006. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J. Biotechnol.* 122:372–81. [accessed 2017 Mar 22].
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165605007960>
- Sundqvist G, Figdor D, Hånström L, Sörlin S, Sandström G. 1991. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand. J. Dent. Res.* 99:117–29. [accessed 2018 May 14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2052893>
- Tan X, Essengue S, Talreja J, Reese J, Stechschulte DJ, Dileepan KN. 2007. 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.* 179:7899–906. [accessed 2018 Feb 15].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025237>
- Taylor FB, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K, Edgington TS. 1991. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ. Shock* 33:127–34. [accessed 2018 Mar 28].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2044206>
- Tonetti MS, D' Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P, Deanfield J. 2007. Treatment of Periodontitis and Endothelial Function. *N. Engl. J. Med.* 356:911–920. [accessed 2018 Apr 24].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329698>
- Tonetti MS, Van Dyke TE, workshop working group 1 of the joint E. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J. Periodontol.* 84:24.
- Trepicchio WL, Wang L, Bozza M, Dorner AJ. 1997. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB. *J. Immunol.* 159:5661–70. [accessed 2018 May 19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9548510>
- Tsutsumi T, Takeshi T, Nakashima K, Keisuke N, Isoda T, Takaaki I, Yokota M, Makoto Y, Nishihara T, Tatsuji N. 2010. Involvement of adhesion molecule in in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J. Periodontal Res.* 45:550–6. [accessed 2017 Mar 27].
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0765.2010.01270.x>
- Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, Batal I, Cullere X, Luscinskas FW, Zhang Y, Stavrakis G, García-Cardena G, Horwitz BH, et al. 2013. Endothelial TNF Receptor 2 Induces IRF1 Transcription Factor-Dependent Interferon- β Autocrine Signaling to Promote Monocyte Recruitment. *Immunity* 38:1025–1037. [accessed 2018 Apr 17].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623383>
- Wang J, He W, Xu X, Guo L, Zhang Y, Han S, Shen D. 2017. The mechanism of TGF-

- β /miR-155/c-Ski regulates endothelial–mesenchymal transition in human coronary artery endothelial cells. *Biosci. Rep.* 37:BSR20160603. [accessed 2018 Apr 25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28607031>
- Williams DF. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29:2941–2953. [accessed 2018 Apr 30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440630>
- Yew HS, Chambers S, Roberts S, Holland D, Julian K, Raymond N, Beardsley J, Read K, Murdoch D. 2014. The Association Between HACEK Bacteraemia And Endocarditis. *J. Med. Microbiol.*
- Yurdagul A, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. 2016. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem. J.* 473:1281–1295. [accessed 2017 Aug 14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208212>
- Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Du Y, Oguchi S, Yamamoto M. 2010. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:143–151.
- Zhang X, Thomas V, Xu Y, Bellis SL, Vohra YK. 2010. An in vitro regenerated functional human endothelium on a nanofibrous electrospun scaffold. *Biomaterials* 31:4376–4381.
- Zohlhofer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schomig A, Neumann FJ. 2000. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1beta-dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:353–359.

9. ANEXOS

Durante el desarrollo de esta tesis se generaron los siguientes productos relacionados:

9.1 Artículo 1.

GUALTERO ESCOBAR, Diego Fernando et al. Purificación y caracterización de lipopolisacáridos de *Eikenella corrodens* 23834 y *Porphyromonas gingivalis* W83. *Rev. colomb. biotecnol* [online]. 2014, vol.16, n.1, pp.34-44. ISSN 0123-3475. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44224>.

9.2 Artículo 2.

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. doi: 10.1111/omi.12201. Epub 2017 Nov 6. Review.PMID:28984079

9.3 Artículo 3.

Gualtero DF, Lafaurie GI, Fontanilla MR. Differential responses of endothelial cells on threedimensional scaffolds to lipopolysaccharides from periodontopathogens. *Mol Oral Microbiol.* 2019;00:1–11. <https://doi.org/10.1111/omi.12263>