

**EFFECTO DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EN LA ACTIVACIÓN Y ADHESIÓN
DE PLAQUETAS HUMANAS EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS ENDOTELIALES**

Tatiana Quintero Romero

Karen Rojas Russi

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
NOVIEMBRE 2018. BOGOTA DC.**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Efecto de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> en la Activación y Adhesión de Plaquetas Humanas en Co-cultivo con Células Endoteliales
Línea de investigación:	Biotechnología
Institución participante:	Laboratorio de Biotechnología Instituto UIBO (Unidad de Investigación Básica Oral) Facultad de Odontología - Universidad El Bosque
Tipo de investigación:	Pregrado
Estado	PROTOCOLO
Estudiantes/ residentes:	Tatiana Quintero Romero - Karen Rojas Russi
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor temático:	Dra. Diana Marcela Buitrago Ramírez
Asesor estadístico	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a Dios, por permitirnos culminar exitosamente este proceso, el cual fue de gran importancia para nuestra vida personal y profesional.

A nuestros padres y familiares, porque gracias a su esfuerzo estamos dando este gran paso, por el amor y apoyo que nos brindaron a lo largo de esta etapa.

Agradecemos la confianza, apoyo y dedicación de nuestra directora del proyecto de investigación, Diana Marcela Buitrago Ramírez, por compartirnos sus conocimientos y brindarnos la oportunidad de desarrollar nuestro proyecto de grado en tan valiosa investigación, aportando a nuestro crecimiento profesional y personal.

A los investigadores: Sergio Viafara, Giovanni Delgado, Yersson Chacón y Johanna Morantes por su apoyo y colaboración en el desarrollo de diferentes procesos fundamentales para la conclusión satisfactoria del proyecto.

Y a todas las demás personas que hicieron posible que este proyecto culminara con éxito.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Introducción

2.	Marco teórico	3
2.1.	Estructura de lipopolisacárido	4
2.2.	Asociación de la enfermedad periodontal y riesgo cardiovascular	5
2.3.	Asociación de la enfermedad periodontal y Aterosclerosis	6
2.4.	Efecto del lipopolisacárido sobre la disfunción endotelial	9
2.5.	Fisiología de la agregación plaquetaria	11
2.5.1.	Hemostasia primaria	11
2.5.2.	Proceso de activación y adhesión plaquetaria	12
3.	Planteamiento del problema	15
4.	Justificación	17
5.	Situación actual	20
6.	Objetivos	22
6.1.	Objetivo general	22
6.2.	Objetivos específicos	22
7.	Metodología del proyecto	23
7.1.	Tipo de estudio	23
7.2.	Población y muestra	23
7.3.	Métodos y técnicas para la recolección de la información	23
7.3.1.	Extracción y purificación de lipopolisacárido de la bacteria <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	23
7.3.3.	Viabilidad de plaquetas humanas estimuladas con LPS de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	24
7.3.4.	Estudio piloto de estimulación con LPS de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> en el modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas	25
7.3.5.	Determinación de moléculas de adhesión (P- selectina) y activación (PAC) en el modelo de co-cultivo estimulado con LPS de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	27
7.3.6.	Cuantificación de Tromboxano A (TXA) en el modelo de co-cultivo estimulado con LPS de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	27
7.4.	Plan de tabulación y análisis	28
7.4.1.	Hipótesis estadísticas (alterna y nula)	28
8.	Consideraciones éticas	29
8.1.	Consentimiento informado	30

9. Resultados	31
9.1. Fase analítica	31
9.1.1. Purificación y caracterización del LPS de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	31
9.1.2. Viabilidad en HCAECs estimuladas con LPS de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	32
9.1.3. Viabilidad y toxicidad de plaquetas humanas estimuladas con LPS de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , microscopia de fluorescencia	32
9.1.4. Citotoxicidad plaquetaria estimulada con lipopolisacárido de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	34
9.1.5. Viabilidad plaquetaria y celular en modelo de co-cultivo estimulada con lipopolisacárido de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	35
9.1.6. Determinación del modelo de co-cultivo para los ensayos de adhesión y activación plaquetaria.	35
9.1.7. Activación de PAC y P/E-selectina en células HCAEC y Plaquetas humanas estimulados con LPS y bacteria completa de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	36
9.1.8. Porcentaje de expresión de P-selectina en células endoteliales HCAEC	37
9.1.9. Porcentaje de expresión de complejo de activación plaquetaria (PAC).	38
9.1.10. Cuantificación de niveles de Tromboxano A2 en el modelo de co-cultivo de HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con LPS y bacteria completa de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	39
10. Discusión	41
11. Conclusiones	43
12. Referencias	44
13. Anexos	50

Resumen

Efecto de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en la Activación y Adhesión de Plaquetas Humanas en Co-cultivo con Células Endoteliales

Antecedentes: Los estudios epidemiológicos han establecido una asociación clínica entre la enfermedad periodontal y la aterosclerosis. Los episodios de bacteremia y endotoxemia en pacientes con periodontitis parecen vincular estas dos enfermedades al inducir una producción de marcadores cardiovasculares en todo el cuerpo. La presencia de bacterias orales en lesiones ateroscleróticas en pacientes con periodontitis sugiere que las bacterias, o sus componentes antigénicos, inducen alteraciones en el endotelio asociado con la aterosclerosis. Por lo tanto, se puede construir un mecanismo causal que explique la asociación entre ambas enfermedades utilizando modelos *in vitro*. Se ha demostrado anteriormente que la disfunción endotelial, se asocia con un aumento de la expresión de algunas moléculas de adhesión (PECAM-1, VECAM-1 y P-selectina), así como la activación de las plaquetas; del mismo modo muestran la correlación existente entre P-selectina y su efecto proagregante plaquetario y la progresión de las enfermedades cardiovasculares. **Objetivo:** Evaluar la expresión y el efecto del LPS de *A. actinomycetemcomitans* sobre la adhesión y activación de plaquetas humanas en células endoteliales. **Materiales y métodos:** Se elaboró un modelo de co-cultivo con plaquetas humanas y células HCAEC, el cual se estimuló con LPS de *A. actinomycetemcomitans* (1,0 3,5 y 7,0 µg/mL) a dosis repetidas. Se evaluaron la molécula de adhesión (P-selectina) y activación (PAC) por medio de citometría de flujo y Tromboxano A2 mediante ELISA. **Resultados:** Se evidenció que el LPS de *A. actinomycetemcomitans* induce un aumento en la expresión de P-selectina y tromboxano A2 en células endoteliales HCAEC a una concentración de 7.0 µg/DC y 3.5 µg/dL respectivamente en relación al control SE. No se encontraron cambios significativos en la expresión de esta molécula en plaquetas ($p < 0,05$). **Conclusiones:** El LPS de *A. actinomycetemcomitans* induce un aumento de la expresión de P-selectina en células endoteliales HCAEC lo cual sugiere un efecto de esta bacteria sobre adhesión en procesos aterotrombóticos.

Palabras claves: Lipopolisacárido, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Enfermedad cardiovascular, célula endotelial, adhesión plaquetaria.

Abstract

Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in the Activation and Adhesion of Human Platelets in Culture with Endothelial Cells

Background: Epidemiological studies have established a clinical relation between periodontal disease and atherosclerosis. Bacteraemia and endotoxemia episodes in patients with periodontitis seen to relate these two diseases by inducing a production of cardiovascular markers throughout the body. Presence of oral bacteria in atherosclerotic lesions in patients with periodontitis suggests the bacteria, or its antigen components, induce alterations in the endothelium leading to such association. A causal mechanism may be developed which explains such association using *in vitro* models. It has been shown that an endothelial dysfunction is associated with the increment in the expression of some adhesion molecules (PECAM-1, VECAM-1 and P-selectin) as well as platelet activation; the relation between P-selectin, its platelet pro-aggregating effect and the progression of cardiovascular diseases has been shown as well. **Objective:** to evaluate the expression and effect of *A. actinomycetemcomitans* on adhesion and activation of human platelets on endothelial cells. **Materials and methods:** A culture with human platelets and HCAEC cells was put together and stimulated with LPS of *A. actinomycetemcomitans* (1,0 3,5 and 7.0 µg/mL) with repetitive dosages. The adhesion molecule (P-selectin) and activation (PAC) were evaluated with flow cytometry and thromboxane A2 with ELISA. **Results:** It was evidenced that the LPS of *A. actinomycetemcomitans* induces an increment of the expression of P-selectin and thromboxane A2 in HCAEC endothelial cells with a concentration of 7.0 µg/DC y 3.5 µg/dL respectively with relation to the SE control. No significant changes were found on the expression of these platelets (p<0.05). **Conclusions:** the LPS of *A. actinomycetemcomitans* induces an increment of in the expression of P-selectin and HCAEC endothelial cells suggesting an effect of this bacteria on the adhesion of atherothrombotic processes.

Key words: lipopolysaccharide, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cardiovascular disease, platelet aggregation.

Introducción

La cavidad oral sirve de huésped para una gran cantidad de microorganismos cuyas especies difieren en los dientes, encías, mejillas, el surco gingival o paladar, e interactúan tanto en la salud como en la enfermedad (Cruz *et al.*, 2017). La boca ha sido reconocida durante mucho tiempo como una fuente de infecciones sistémicas, desde donde se permite el paso de bacterias al torrente sanguíneo debido a interrupciones de la integridad del tejido secundarias a la inflamación en afecciones como la periodontitis (Peña *et al.*, 2008).

La periodontitis se describe como una enfermedad crónica de mayor incidencia en el adulto (15%-20% en edades de 35 a 44 años), su presencia en cavidad oral sumado al desbalance microbiano parece perpetuar una respuesta sistémica mediada por antígenos de bacterias que activan anticuerpos, células endoteliales, monocitos y plaquetas generando un aumento en los niveles circulantes de citosinas, proteínas de fase aguda, factores inflamatorios y coagulantes que aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, siendo esta la primer causa de muerte en el mundo, esta a su vez está altamente relacionada con factores extrínsecos como obesidad, consumo nocivo de cigarrillo y alcohol, mala alimentación ; e intrínsecos como edad, sexo o genética, que en conjunto reflejan un espectro de patología oral desde gingivitis hasta periodontitis severa. (Bascones y Figuero, 2005) (OMS, 2011)

A partir de estas observaciones, se ha generado mucha evidencia sobre la relación entre la enfermedad periodontal y la aparición de enfermedades sistémicas no infecciosas como enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas (ASCVD), cardiopatía isquémica (IHD), enfermedad cerebrovascular (CBVD) . (Leng *et al.*, 2015)

Estudios han demostrado mayor incidencia de complicaciones ateroscleróticas en pacientes con enfermedad periodontal, presentando principalmente bolsas periodontales, dentro de las cuales se encuentran microorganismos asociados como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que al presentar su endotoxina (LPS) interactúan con neutrófilos y monocitos favoreciendo así la reacción inflamatoria y la formación del trombo por agregación plaquetaria. Lo que puede alterar la integridad del endotelio vascular

favoreciendo la adhesión de moléculas alterando el flujo sanguíneo normal. (Sfyroeras *et al.*, 2012)

Por esta razón el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del LPS de *A. actinomycetemcomitans* sobre la adhesión y activación de las plaquetas utilizando un modelo de co-cultivo con células endoteliales, además de determinar y evaluar la expresión o niveles de ciertas moléculas coadyuvantes mediante procesos de viabilidad y purificación celular.

Dicho trabajo participará positivamente a la creación de nuevas y diferentes alternativas terapéuticas favoreciendo la calidad de vida y prolongación de la misma a largo plazo, disminuyendo así enfermedades aterotrombóticas y cardiovasculares tratando en primer plano enfermedades crónicas prevalentes como es la periodontitis en cavidad oral. Este proyecto se va a enfocar en evaluar y estandarizar mediante el modelo in vitro de co-cultivo el efecto del lipopolisacárido (LPS) de *A. actinomycetemcomitans* en la disfunción endotelial de células de aorta coronaria humana (HCAEC) y en la adhesión y agregación plaquetaria, donde se podrán establecer los posibles mecanismos moleculares que los LPS de periodontopatógenos inducen a una enfermedad cardiovascular.

2. Marco teórico

La periodontitis implica un proceso infeccioso / inflamatorio crónico que afecta a los tejidos de soporte del diente, incluidos el ligamento periodontal y el hueso alveolar. La principal consecuencia de la periodontitis es la pérdida de las estructuras de soporte dental y la pérdida de dientes. Los datos muestran que la prevalencia o la presencia de dicha condición en la población son de aproximadamente 10% a 15%; Sin embargo, la progresión suele ser lenta y/o progresiva dependiendo de los diferentes mecanismos de virulencia de los microorganismos y el desarrollo inmunológico que presente el huésped. (Peña, 2008) (Teeuw *et al.*, 2014).

Su etiología es multifactorial, está viéndose afectada por el consumo de tabaco, dieta, hábitos y ciertas enfermedades sistémicas como factores clínicos contribuyentes a la enfermedad; al mismo tiempo los microorganismos presentes en la cavidad oral pueden jugar un papel determinante para desencadenar, perpetuar y complicar las patologías. (OMS, 2012)

Los organismos que se encuentran en cavidad oral según análisis realizados a dichos patógenos, se determinó que los microorganismos estarían formando grupos o complejos bacterianos. Hasta el momento, seis complejos han sido descritos por Socransky *et al.* (1998): Complejo azul, amarillo, verde, morado, naranja y rojo donde se encuentran diferentes bacterias asociadas a la periodontitis; Sin embargo *A. actinomycetemcomitans* no se encuentra dentro de los complejos descritos anteriormente y se ha asociado especialmente con la progresión de la periodontitis agresiva en el adulto, aunque no se ha rechazado su importancia en la iniciación y progresión de la enfermedad periodontal. (Mujica *et al.*, 2010)

2.1. Estructura de lipopolisacárido

El *A. actinomycetemcomitans*, es una bacteria Gram-negativo es el principal agente etiológico de la periodontitis agresiva, también se ha relacionado con la periodontitis crónica y las infecciones no orales graves (Henderson *et al.*, 2010). Actualmente, se reconocen siete serotipos de esta bacteria (ag) en función del antígeno inmunodominante, que es un polisacárido O del lipopolisacárido (LPS). (Takada *et al.*, 2010) (Kittichotirad *et al.*, 2011)

El Lipopolisacárido son polímeros complejos con restos de ácidos forman la mayoría de la capa externa de la membrana de bacterias Gram-negativas. Estos, actúan como endotoxinas que induce una respuesta inmune local y sistémica en el hospedero. Estas moléculas están conformadas por tres regiones: el antígeno O, el oligosacárido central o núcleo y el lípido A. El antígeno O es una región que garantiza la existencia de múltiples serotipos. El núcleo permite que se adhieran a tejidos epiteliales además de proporcionar protección contra reacciones dañinas de anticuerpos. El lípido A es el encargado de ejercer la actividad endotóxica de los LPS. (Serrano *et al.*, 2008) (Romero e Iregui, 2010)

El LPS es un glicoconjugado lipídico que mantiene la integridad estructural de las bacterias Gram Negativo y forma una barrera selectiva que limita la entrada de moléculas hidrofóbicas y químicos tóxicos, como detergentes y antibióticos, además es esencial para el anclaje de proteínas externas de membrana. Las investigaciones serológicas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* han identificado serotipos específicos y antígenos bacterianos que pueden ser importantes en la etiología de la enfermedad periodontal. Hasta ahora se han descrito siete serotipos a, b, c, d, e, f y g, lo que deja un 3-8% de aislados clínicos no serotificables. La prevalencia de estos serotipos se asocia con una serie de factores, como la localización, geográfica, la etnia y el estado periodontal de los portadores. (Rojas, 1995) (Brigido *et al.*, 2014)

Investigaciones recientes han analizado el papel del lipopolisacárido de los diferentes serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en células dendríticas, así como en la activación y función de los linfocitos T, demostrando diferencias cuantitativas y cualitativas en la

producción de citocinas. Específicamente, las células dendríticas estimuladas con el serotipo b experimentaron un aumento en la producción de citocinas en comparación con las mismas células estimuladas con los otros serotipos bacterianos (Rojas, 1995) (Fuentes *et al.*, 2008).

Los linfocitos T estimulados con el serotipo b evidenciaron un incremento en la expresión de los factores de transcripción T-bet y RORC2, en la secreción de citocinas asociadas a los fenotipos linfocitarios Th1 y Th17: interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y TNF- β , así como también un aumento en la producción del ligando de receptor activador para el factor nuclear kB (RANKL), factor asociado a la activación de osteoclastos, inhibiendo la síntesis de colágeno tipo y favoreciendo la reabsorción del hueso alveolar. (Brigido *et al.*, 2014) (Beca *et al.*, 2017)

2.2. Asociación de la enfermedad periodontal y riesgo cardiovascular

Los estudios epidemiológicos proporcionan evidencia de una asociación entre la periodontitis y la enfermedad cardiovascular. La verosimilitud biológica de esta asociación se basa principalmente en el hecho de que los pacientes con periodontitis presentan niveles elevados de PCR, TNF- α , interleucinas y otros marcadores inflamatorios, que están asociados con la disfunción endotelial y los eventos cardiovasculares. (Beca *et al.*, 2017) (Bahekar *et al.*, 2007) (Dietrich *et al.*, 2013)

La periodontitis puede desempeñarse como un posible factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. La enfermedad cardiovascular incluye la aterosclerosis, cardiopatía isquémica, endocarditis, infarto agudo de miocardio y accidente cerebrovascular. Según datos de la Organización Mundial de la Salud la mortalidad anual en el año 2015 por estas enfermedades fue alrededor de 17,7 millones de personas, lo que representa el 31% de las muertes en el mundo. (Joshipura *et al.*, 2004) (OMS, 2017)

Los factores de riesgo tradicionales para la enfermedad cardiovascular son: hábito del cigarrillo, hipertensión, aumento en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y disminución

en las de alta densidad, diabetes mellitus, historia familiar, enfermedades cardiacas prematuras, obesidad e inactividad física. Siendo estos factores de riesgo similares a los de la enfermedad periodontal. (Persson *et al.*, 2008) (WHO, 2005)

2.3. Asociación de la enfermedad periodontal y Aterosclerosis

En la bolsa periodontal se encuentran gran cantidad de bacterias Gram-negativas que entran en contacto con el tejido subyacente y con los vasos sanguíneos periodontales. A partir de esta infección periodontal se produce una bacteriemia crónica se produce liberación de citoquinas como la CRP, la 1- antitripsina, la haptoglobina, el fibrinógeno, los tromboxanos, la IL-1, 6, 8 y el TNF, pasan a la circulación general. Estos factores pueden iniciar la adhesión y agregación plaquetaria, promoviendo la formación de células espumosas y la acumulación de colesterol en la capa íntima arterial favorece la arteriosclerosis y la trombosis, produce una enfermedad coronaria. (Paquette *et al.*, 2007) (Hansson, 2005)

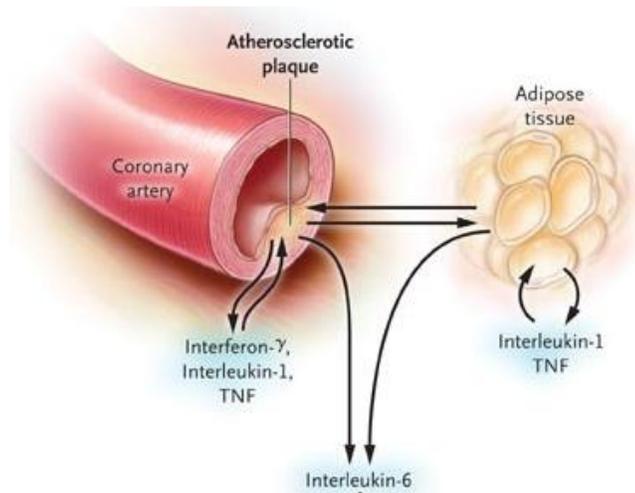


Figura 1. Liberación de citoquinas (Hansson, 2005)

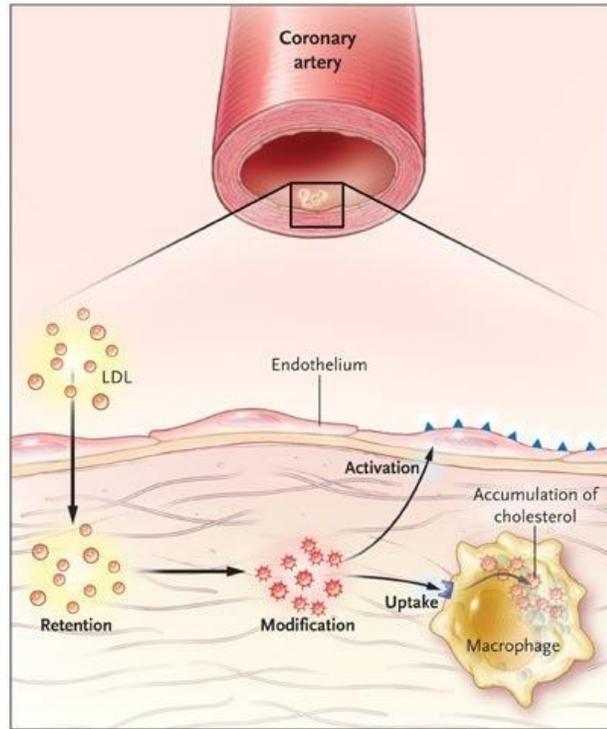


Figura 2. Depósito de colesterol (LDL) (Hansson, 2005)

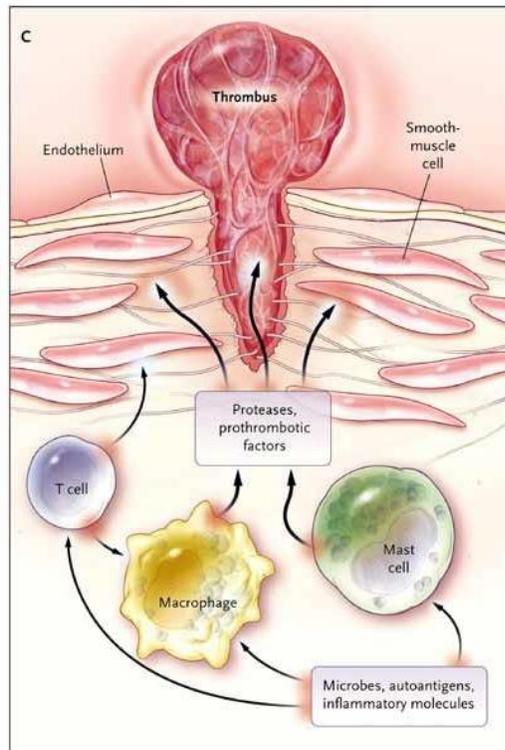


Figura 3. Lesión aterosclerótica en la arteria (Hansson, 2005)

El carácter inflamatorio de la aterosclerosis ha centrado diferentes investigaciones al estudio de las infecciones crónicas como potencial causa de las lesiones ateroscleróticas siendo las primeras evidencias que mostraban asociación entre infección bacteriana y enfermedad coronaria crónica e infarto agudo de miocardio (IAM). (Offenbacher *et al.*, 1999)

Estudios realizados sobre los niveles de colesterol en animales y en células cultivadas han mostrado el papel de la inflamación en la aterosclerosis. Las LDL, también conocidas como colesterol malo, están compuestas por moléculas grasas y proteínas, encontrándose aumentadas en la aterogénesis.

En normalidad, las células endoteliales son resistentes a la adhesión de leucocitos circulantes, pero varios factores de riesgo como fumar, hipertensión, obesidad, entre otros, pueden dañar la homeóstasis, generando cambios inflamatorios celulares y vasculares que inician la aterogénesis. Estos factores promueven la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales, generando disfunción endotelial. El exceso de LDL genera cambios químicos que estimulan la liberación de moléculas de adhesión por las células endoteliales. Estos cambios atraen monocitos circulantes y células T. (Alonso *et al.*, 2008)

Posteriormente ocurre la formación de estrías lipídicas –placa aterosclerótica temprana-. Durante esta etapa se presentan los siguientes fenómenos: penetración de monocitos por diapedesis en la capa íntima, maduración del monocito en macrófagos, fagocitosis del colesterol y acúmulo en su citoplasma, hasta transformarse en células espumosas. Luego se da una progresión del ateroma a una placa compleja, y las células del músculo liso de la capa media migran a la capa íntima, produciendo un tejido fibroso. En el estado más avanzado las células espumosas secretan sustancias inflamatorias que rompen esta placa digiriendo moléculas de matriz y dañando las células de músculo liso; además se puede romper por trauma o extremo adelgazamiento de la capa íntima, llevando a la formación de un trombo en el sitio. (Alonso *et al.*, 2008)

Las citoquinas liberadas interleuquina 1(IL-1), interleuquina 6 (IL-6), y factor de necrosis tumoral α (TNF α), por monocitos, linfocitos o células endoteliales tienen un papel importante en la regulación de la inflamación, pero al mismo tiempo pueden aumentar el riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Logran activar tres elementos de la inflamación: 1) Aumento de las moléculas de adhesión celular (ICAM -1 y VCAM-1) y selectinas e y p, que facilitan el reclutamiento de leucocitos y plaquetas que conllevan a la disfunción endotelial y migración de células del músculo liso de la capa media. 2) Liberación de leucocitos y plaquetas por la médula ósea estimulada por la IL-6 especialmente. 3) Incremento en la síntesis y liberación de proteínas plasmáticas en el hígado como la proteína C reactiva (CRP), el amiloide A y algunos factores de la hemostasia como el factor VIII/Von Willebrand. La activación de estos tres elementos lleva a la formación del ateroma o directamente a la trombosis.

El incremento de CRP puede estar relacionado con el aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular por su adhesión a LDL en las placas ateromatosas; también activan el sistema de complemento, tienen un efecto proinflamatorio e incrementan la producción de macrófagos (Lowe, 2001) (De Nardin, 2001). El fibrinógeno es una proteína de fase aguda que es sintetizada en el hígado como respuesta a la IL-6 y se encuentra aumentada en infecciones e inflamaciones crónicas, considerándose un importante factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares. (De Nardin, 2001).

De esta manera, se cree que el aumento de citocinas pro-inflamatorias encontrado en sangre inducido por la periodontitis podría jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades y condiciones sistémicas.

2.4. Efecto del lipopolisacárido sobre la disfunción endotelial

Parámetros clínicos como el sangrado gingival hacen parte de la inmunopatogenia de asociación entre periodontitis y aterosclerosis ya que bacteriemias transitorias han sido ampliamente reportadas en pacientes con periodontitis; lo cual se traduce en mayores niveles de marcadores biológicos de inflamación como son el TNF α , IL-1, IL-6 y PCR ultrasensible; comparados con pacientes que no sufren periodontitis. (Glurich *et al.*, 2002) (Loos *et al.*, 2000)

Se ha comprobado que estas bacteriemias y endotoxémias pueden darse después de procedimientos terapéuticos como pueden ser el raspaje y alisado radicular, cirugía periodontal y extracciones dentales e incluso con las actividades diarias como la masticación y el cepillado (Kinane *et al.*, 2005) (Iwai, 2009). Recientemente se demostró que el tratamiento periodontal induce inflamación sistémica y disfunción endotelial a corto tiempo (24 horas), pero a largo plazo (6 meses) las reduce (Tonetti, 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. (Lockhart *et al.*, 2012)

La respuesta inmune innata está fuertemente implicada en la asociación entre periodontitis y enfermedad cardiovascular siendo la activación inflamatoria de la célula endotelial un factor crítico en el desarrollo de aterosclerosis, capaz de ser inducida no solamente por la bacteria completa sino también por LPS. Estas bacterias o sus endotoxinas pueden alterar la integridad del endotelio vascular, y favorecer la liberación de citoquinas como la IL-1, IL-6 y el TNF- α y de CRP. (Katz *et al.*, 2001) (Kinane, 1998)

El modelo que explica la posibilidad de desarrollar aterosclerosis mediado por endotoxinas basado en estudios *in vitro* con *E. coli* propone que los LPS en circulación se unen a la proteína de unión a LPS (LBP) facilitando su unión a los CD14 soluble (sCD14) o a CD14 de membrana (mCD14) lo que conduce a la activación de células del endotelio vía TLR4. Como respuesta al estímulo, las células endoteliales producen moléculas pro-inflamatorias como IL-6, TNF alfa,

superóxido (O₂⁻), IL-8 y proteína quimioattractante de monocito (MCP-1). Estas dos últimas inducen el reclutamiento de monocitos y linfocitos T en lesiones sub-endoteliales potenciando la adhesión leucocítica al endotelio a través de moléculas de adhesión intercelular (VCAM-1, ICAM-1) que acompañado de la expresión de molécula-1 de adhesión celular plaqueta/endotelio (PECAM-1) permite la migración trans-endotelial del monocito hacia el sub-endotelio. (Hischfeld *et al.*, 2001) (Rurenga *et al.*, 2013) (Nakamura *et al.*, 2008) (Stoll *et al.*, 2004).

2.5. Fisiología de la agregación plaquetaria

2.5.1. Hemostasia primaria

Es el proceso inicial en la agregación plaquetaria y en el que se da la formación del tapón luego de la aparición de fallas en el epitelio vascular, se genera a partir de 3 mecanismos o fases:

- Adhesión
- Activación y secreción
- Agregación

Todo este proceso inicia a partir de la lesión del endotelio, luego de que este aparezca, las plaquetas se adhieren al subendotelio que es la capa más cercana al torrente sanguíneo. Este es el proceso que se conoce como adhesión plaquetaria, en donde el actor principal es el colágeno, este es modificado por el factor de von Willebrand (FvW) lo cual facilita su unión a la glicoproteína plaquetaria (GPIb/IX) para así lograr la fijación de la plaqueta al colágeno.

Al activarse las plaquetas se deforman convirtiéndose en esferas con prolongaciones del citoplasma, más conocidos como pseudópodos e inicia simultáneamente la secreción de sustancias desde los gránulos, como: adenosin trifosfato, factor plaquetario 4, calcio, serotonina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, tromboxano A₂, factor V, fibrinógeno, de los cuales podemos considerar algunos como agonistas en el proceso de

agregación plaquetaria, estimulando la unión de unas plaquetas con otras, mediante el reclutamiento de células y el crecimiento del coágulo y a este último mecanismo se le conoce como agregación plaquetaria. (King, 1962).

2.5.2. Proceso de activación y adhesión plaquetaria

Las funciones realizadas por las plaquetas necesitan ser reguladas por un organismo, que permite un acople adecuado de las respuestas extracelulares e intracelulares. En cada etapa de la agregación plaquetaria actúan ciertos mecanismos específicos para cada una de ellas.

El proceso de adhesión comienza con el deslizamiento de los leucocitos sobre la superficie endotelial, la posterior adhesión y finalmente su transmigración. La fase de rodamiento y adhesión resulta de la interacción específica entre los leucocitos y las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio. El rodamiento representa la interacción entre los leucocitos y las selectinas, con la consiguiente adhesión en la que participan otras CAM de la familia de las inmunoglobulinas, la como molécula de adhesión intercelular (ICAM), molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM/CD31) y molécula de adhesión vascular (VCAM) (figura. 4).

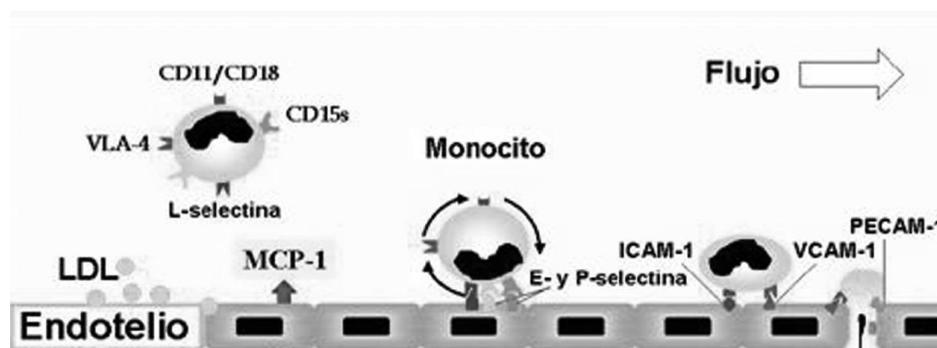


Figura 4. Moléculas de adhesión al endotelio vascular (Badimón, 2006)

Los niveles de expresión de las CAM en las lesiones ateroscleróticas son superiores a los de las áreas que no presentan aterosclerosis; esta sobreexpresión de CAM, junto con la inducción

de sustancias químico atrayentes como proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), facilita la unión y la migración de los monocitos en las áreas de lesión. El endotelio activado por agentes proinflamatorios y aterogénicos (citocinas, LDLox, etc.) expresa CAM que no se hallan presentes en el endotelio normal, como VCAM-1, y sobre expresa otras, como ICAM-1 (Johnson *et al.*, 1994).

Familia	Molécula/nomenclatura (CD)	Célula	Ligando
Selectinas	Selectina E (ELAM-1, CD62E)	Endotelio	Sialil-Lewis ^x y Lewis ^a
	Selectina P (CD62P, PADGEM)	Endotelio, plaquetas	Sialil-Lewis ^x y Lewis ^a
	Selectina L (CD62L)	Leucocitos	Sialil-Lewis ^x y Lewis ^a
Inmunoglobulinas	ICAM-1 (CD54)	Endotelio, líneas leucocitarias	LFA-1 y Mac-1
	ICAM-2	Endotelio, plaquetas	LFA-1 y Mac-1
	ICAM-3 (CD50)	Leucocitos	
	VCAM-1 (CD106)	Endotelio, CML	VLA-4
	PECAM-1 (CD31)	Endotelio, plaquetas, leucocitos	
Integrinas	VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$)	Leucocitos (monocitos, linfocitos)	
	LFA-1 (CD11a/CD18)	Leucocitos (monocitos, linfocitos)	ICAM-1 y -2
	Mac-1 (CD11b/CD18)	Leucocitos (monocitos)	ICAM-1 y -2
	P150, 95 (CD11c/CD18)	Leucocitos (monocitos)	

CML: célula muscular lisa; ELAM: molécula de adhesión de endotelio-leucocito; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión vascular; PECAM: molécula de adhesión de plaquetas y células endotelias; LFA: antígeno asociado a función de leucocitos; VLA: antígeno de activación muy tardía.

Figura 5. Moléculas de adhesión (Badimón, 2006)

El antígeno de diferenciación CD31 o PCAM se expresa en la superficie de granulocitos humanos, monocitos y plaquetas. Por consiguiente, desempeña un papel importante en los procesos de adhesión y señalización celular en la biología de las células sanguíneas y vasculares.

Amplios estudios junto con información funcional y estructural han demostrado que inmunoglobulina D-1 (IgD1) e inmunoglobulina D-2 (IgD2) funcionan principalmente en mediar las interacciones hemofílicas de PECAM-1 entre leucocitos y células endoteliales además de concentrar PECAM-1 en células endoteliales, donde funciona como un importante mecanosensor endotelial y como regulador de la permeabilidad vascular (70,71). PECAM-1 se ha relacionado de manera previsible con varios trastornos clínicamente relevantes, que van desde la trombosis y la enfermedad cardiovascular hasta la inflamación y el cáncer.

La glicoproteína b alfa (GPIb α) actúa en la primera fase, frenando las plaquetas sobre la superficie de la pared vascular, posteriormente esta se une al colágeno y el factor de von Willebrand (vWF) dando inicio al proceso de adhesión plaquetaria, en este complejo el FvW se encuentra contenido en las fibras de colágeno, especialmente de tipo I, III y IV. En las arterias que son consideradas vasos que mantienen un alto estrés de rozamiento el dominio A1 del vWF interactúa con la GPIb α , para lograr reducir la velocidad del flujo plaquetario. Aun así, la GPIb α también desempeña el papel de receptor de las moléculas de adhesión celular -1 (Mac-1), las cuales son proteínas que se localizan en la superficie de los leucocitos activados, cuando genera la interacción entre GPIb α y Mac-1 se produce la unión entre plaqueta y leucocito, siendo este un proceso crucial para la respuesta inflamatoria mediada por las plaquetas.

Además cuando el FvW y la GPIb α interactúan momentáneamente dan paso al rodamiento de plaquetas en la zona afectada del vaso y permitiendo que las proteínas que se encuentran en la pared vascular especialmente el colágeno induzcan la activación de las plaquetas, adhiriéndolas firmemente a la pared, formando así un tipo de unidad funcional que permite la formación inicial del trombo en la cual el FvW inicialmente captura las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que las plaquetas se unan de una manera estable entre sí. Cuando la plaqueta y el colágeno se unen aparecen dos receptores plaquetarios, la integrina $\alpha 2\beta 1$ y la glicoproteína VI (GPVI), permitiendo una mejor fijación de las plaquetas y generando la secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias promoviendo el crecimiento y consolidación del trombo.

Luego de que las plaquetas se unen al colágeno se expresa la fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria generando actividad en la protrombinasa generando un aumento en la producción trombina. El complejo formado gracias a la adhesión y fijación de las plaquetas en la pared del vaso puede durar horas o días sobre la lesión vascular y liberará microvesículas con capacidades proinflamatorias y protrombóticas, luego de la unión entre las plaquetas el FvW y el colágeno es necesario reclutar nuevas plaquetas provenientes del torrente sanguíneo; este proceso es conocido como la agregación plaquetaria el cual se produce gracias a la acumulación de agonistas de activación de plaquetas en el lugar afectado,

dichos agonistas son secretados por las plaquetas, entre ellos encontramos algunos como el adenosin difosfato (ADP), el tromboxano A2 (TxA2), la trombina y la epinefrina. Finalmente se activan los receptores de integrina ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) estos permiten la unión del fibrinógeno y el FvW, dicha unión genera puentes estables entre las plaquetas.

En cuanto al proceso de estabilización de las plaquetas aparece otra molécula llamada el ligando de CD40 (CD40L) el cual es una glicoproteína contenida por los gránulos de las plaquetas y que es liberada tras la degranulación en la superficie plaquetaria, luego a partir de la actividad de la metaloproteasa-2 se induce la liberación de plasma. Tanto el CD40L soluble como el que se une a la plaqueta tienen la capacidad de interactuar con el CD40 existente en células de inmunidad tales como linfocitos B, neutrófilos, monocitos, otras plaquetas, células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos y finalmente células del músculo liso vascular.

No es bien conocido el porqué de la interacción entre el CD40L liposoluble y el CD40, pero la interacción entre el CD40L de la plaqueta con el CD40 de las células endoteliales induce la liberación y expresión de moléculas implicadas en el proceso inflamatorio. Otra de las facultades que tiene el CD40L propio de las plaquetas es que al interactuar con las células endoteliales coronarias las inhabilita para liberar óxido nítrico (NO) aumentando su estrés oxidativo (Vernal *et al.*, 2008).

3. Planteamiento el problema

En las dos últimas décadas varios estudios han planteado diferentes factores de riesgo asociados a la aterosclerosis. La enfermedad periodontal; descrita como una de las infecciones crónicas de mayor incidencia en el adulto, también ha sido definida como un importante factor de riesgo que además de afectar a más de la mitad de la población también se incrementa con la edad al igual que las enfermedades cardiovasculares, siendo esta la primera causa de muerte en el mundo. La periodontitis en adultos toma una consideración especial a nivel vascular favoreciendo la activación de células endoteliales, leucocitos y plaquetas capaces de generar un aumento en los niveles plasmáticos de citocinas, proteínas de fase aguda, factores inflamatorios y coagulantes todos ellos con una incidencia directa en el aumento del riesgo cardiovascular de aterosclerosis o aterotrombosis. (Haynes *et al.*, 2013).

Uno de los microorganismos asociados a la periodontitis es el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bacteria gram negativa con importantes propiedades pro-inflamatorias. El lipopolisacárido (LPS), ha sido descrito clásicamente como uno de los principales factores de virulencia no solamente en la enfermedad periodontal sino también en la respuesta inflamatoria vascular a la cual se le han descrito propiedades tóxicas e inflamatorias como alteración en la integridad del endotelio vascular, favorecer la liberación de citoquinas como la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la proteína C-reactiva (CRP), sin embargo se desconoce el efecto del LPS de periodontopatógenos como *A. actinomycetemcomitans* no solamente sobre células de arteria coronaria humana sino también en la activación o agregación plaquetaria, este último un aspecto fundamental en el desarrollo de procesos aterotrombóticos. (Takeshi *et al.*, 2010) (Delgado *et al.*, 2004) (Jiménez y Machuca, 2005).

Adicionalmente una de las actuales limitaciones de los modelos de endotoxemia *in vitro* consisten en el uso de una única dosis de LPS, aspecto muy importante a considerar ya que no refleja la fisiopatología de la infección puesto que en pacientes con periodontitis se reportan frecuentes periodos de bacteriemias y endotoxemias, lo cual convoca a plantear modelos con más de una dosis con el fin de mimetizar el proceso de la enfermedad. Esto sumado al completo desconocimiento del efecto de LPS de *A. actinomycetemcomitans* sobre la adhesión

y activación plaquetaria y mucho más en modelos de plaquetas humanas en co-cultivo con HACEC hacen de este problema de investigación un aspecto fundamental para el estudio de la asociación entre periodontitis y aterotrombosis.

En algunos reportes de la literatura se han observado los diferentes mecanismos de activación y las respuestas de adhesión inducidas por diferentes agentes bacterianos en diversos tipos celulares, en particular las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC).

La expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales son importantes dentro de la disfunción endotelial; un modelo de mono capas de HUVEC estimulada con adhesinas de *fusobacterium nucleatum* demostró que inducen la adhesión bacteriana mediada por cadherinas VE y mostraron una permeabilidad aumentada, lo que permitió el paso de bacterias; adicionalmente se evaluó en el mismo modelo la adhesión y migración de monocitos en el endotelio en condiciones de flujo sanguíneo normal, encontrando la adhesión de los mocitos en las monocapas estimuladas con LPS de *P. gingivalis*, es decir que se unen a las células endoteliales, este acoplamiento esta mediado por la expresión de moléculas de adhesión (PCAM-1, VCAM-1 e ICAM-1) cuya expresión se activa por la interacción entre el receptor TLR-2 y el LPS(60).

4. Justificación

La enfermedad periodontal incrementa los niveles de inflamación sistémica potencializada por la respuesta del huésped, en la que se observa infiltrado de neutrófilos, macrófagos y algunas células linfoides, con la subsecuente liberación de citoquinas tales como como la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la proteína C-reactiva (CRP). Las bacterias relacionadas con la periodontitis son en gran parte Gram negativas, las cuales por medio de sus lipopolisacáridos y productos estimulan la producción de citoquinas, aumento en la coagulación, activación de monocitos y liberación de las proteínas de fase aguda como CRP. Estos patógenos periodontales pueden causar infecciones sistémicas como afecciones cardiacas, que se pueden dar como resultado de difusión hemática y/o respiratoria. (Calle *et al.*, 2012).

El interés de investigar el efecto de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 29522 en la adhesión activación de plaquetas humanas en co-cultivo con HCAEC se centra en dilucidar el papel aterotrombótico de periodontopatógenos, pues consideramos que los enfoques previos a nivel *in-vitro* se dirigen con una fuerte tendencia a bacterias entéricas, pasando por alto el papel de esto microorganismos. A pesar del diverso conocimiento generado en los últimos 20 años de avances entre la asociación de periodontitis y enfermedades cardiovasculares; aún existen aspectos celulares y moleculares que demandan mayor investigación.

Este estudio se va a enfocar en evaluar y estandarizar mediante el modelo *in vitro* de co-cultivo el efecto del lipopolisacárido (LPS) de *A. actinomycetemcomitans* en la disfunción endotelial de células de aorta coronaria humana (HCAEC) y en la adhesión y agregación plaquetaria. De esta manera, los datos obtenidos en esta investigación tomarán gran trascendencia en el tiempo gracias a que se desarrolla con propiedades y en condiciones diferentes a las reportadas anteriormente, lo que permitirá establecer las bases de una respuesta agregante *in-vitro*, que aún no ha sido caracterizada.

Dicho trabajo también permitirá establecer bases para la generación de nuevas alternativas terapéuticas, considerando un impacto positivo a largo plazo ya que la periodontitis presentada como una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia actualmente, es fundamental para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares de gran incidencia afectando de manera directa la salud y calidad de vida.

5. Situación actual

En diferentes estudios, autores, mencionan una asociación entre el efecto de las bacterias presentes en la periodontitis sobre las células que participan en la patogenia de la aterosclerosis y la trombosis arterial. Esto respaldado por los datos existentes sobre bacteriemia transitoria y marcadores inflamatorios elevados en pacientes con periodontitis. Estas bacterias o sus endotoxinas, como los LPS, pueden alterar la integridad del endotelio vascular, producir una hiperplasia de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos mayores. Esto llevaría a producir una degeneración grasa de la misma y además favorecer la liberación de citoquinas como la IL-1, el TNF y el marcador de inflamación (CRP) proteína C reactiva. Todos estos factores pueden favorecer el desarrollo y evolución de la aterosclerosis y provocar una coagulación intravascular debido a que alteran la función plaquetaria, la coagulación sanguínea y el metabolismo de los lípidos. (Calle *et al.*, 2012).

El papel del periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como posible contribuyente a la aterosclerosis ha sido investigado en sistemas modelo usando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) [7]. Esta bacteria Gram negativa presenta diversos factores o mecanismos de virulencia como los lipopolisacáridos (LPS), el cual se encuentra en la membrana externa y actúa como endotoxina que induce una respuesta inmune local y sistémica en el hospedero. Estas moléculas están conformadas por tres regiones: el antígeno O, el oligosacárido central o núcleo y el lípido A. El antígeno O es una región que garantiza la existencia de múltiples serotipos. El núcleo permite que se adhieran a tejidos epiteliales además de proporcionar protección contra reacciones dañinas de anticuerpos. El lípido A es el encargado de ejercer la actividad endotóxica de los LPS (Brigido *et al.*, 2014).

Múltiples estudios han demostrado que *Aggregatibacter. actinomycetemcomitans* sigue siendo el principal desencadenante junto con la *P. gingivalis* para el desarrollo de la enfermedad periodontal; recientemente, el LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ha demostrado inducir la maduración de monocitos a macrófagos formando así células espumosas que liberan citoquinas [9]. Estas, algunas proinflamatorias como la proteína C reactiva (CRP), el fibrinógeno, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 (IL-1) y la IL-6 reducen la expresión endotelial de óxido nítrico sintetasa (NOS) y por ende su participación en la inhibición de la agregación plaquetaria, promoviendo la expresión endotelial de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), E-selectina y P-selectina [10]. Como resultado, la ausencia de propiedades anti-aterogénicas en el endotelio aumenta la migración de leucocitos y la activación plaquetaria para formar la placa aterosclerótica. (Zahng *et al.*, 1997).

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sobre la adhesión y activación plaquetaria en un modelo de co-cultivo con células de arteria coronaria humana (HCAEC).

6.2. Objetivos específicos

- ❖ Evaluar la expresión de P-selectina en plaquetas humanas en un modelo de co-cultivo con células HCAEC estimuladas con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522.
- ❖ Determinar los niveles de Tromboxano A2 en un modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522.
- ❖ Evaluar la expresión del complejo de activación plaquetaria (PAC) en un modelo de co-cultivo con células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

7. Metodología del proyecto

7.1. Tipo de estudio

Experimental *In Vitro*

7.2. Población y muestra

- **Población:** Plaquetas de donantes voluntarios sanos y células HCAEC
- **Muestra:** Plaquetas humanas obtenidas de la Fundación Hematológica Colombiana de donantes voluntarios sanos mayores de edad con previo consentimiento informado.
- Línea comercial de células endoteliales HCAEC (LONZA, Walkersville USA).

7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información

7.3.1. Extracción y purificación de lipopolisacárido de la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

El LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se obtuvo de las cepas ATCC 29522, las cuales fueron cultivadas en el laboratorio de Microbiología Oral grupo UIBO, mientras que la purificación y caracterización bioquímica del LPS se realizó en el laboratorio de Biotecnología grupo UIBO según metodología reportada por Gualtero y colaboradores (Gualtero *et al.*, 2014).

7.3.2. Viabilidad de HCAECs estimuladas con LPS de *A. actinomycetemcomitans* a dosis repetidas durante 24 horas.

Se usó la línea celular HCAEC (LONZA, Walkersville USA), las cuales se sembraron en medio EGM2 MV (LONZA, Walkersville. USA) entre pases 6-11 a una densidad de 4.000 células/pozo en placas de 96 (CytoOne, Japan) por 20 horas en condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37°C). Las células HCAECs fueron estimuladas 3

veces: dosis 1: durante 6h; dosis 2: durante 6h; dosis 3: durante 12h para un tiempo total de exposición de 24h con LPS de *A. actinomycetemcomitans* 29522 a diferentes concentraciones (7, 3.5, 1 µg/mL). Pasado el tiempo de estimulación el medio fue reemplazado por una solución de resazurina 44µM preparada en medio sin suplementar. Las células en presencia de esta solución se incubaron a 37°C durante 16 horas, transcurrido este tiempo, la fluorescencia emitida por las células viables y/o metabólicamente activas fueron leídas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y una de emisión de 595 nm a través del multilector Tecan/Infinite200 pro Switzerland.

Las muestras celulares sin estímulo o con medio de cultivo fueron consideradas como control de supervivencia, mientras que aquellas tratadas con Tritón al 1% en solución TBS estéril durante 10 minutos fueron definidas como control positivo de muerte celular. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y de manera independiente n: 9. Los datos se analizaron mediante los programas Excel (2010) y STATA (v.13.0), asumiendo como significancia estadística un valor $p < 0,05$.

7.3.3. Viabilidad de plaquetas humanas estimuladas con LPS de A. actinomycetemcomitans

Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) con una concentración de 150.000-350.000 células/µL de los donantes voluntarios sanos (previo consentimiento informado) que asisten a la fundación Hematológica Colombia por el convenio interinstitucional que existe entre la universidad El Bosque y la fundación. La preparación previa de las plaquetas consistió en lavados con Wash Buffer a pH 6.0 y tres series de centrifugación cada una a 2000 RPM por 15 minutos.

Posteriormente se resuspendió en 1 mL de Buffer de re-suspensión a pH 7.4 y de esta manera obtener plaquetas aisladas o libres de plasma para acto seguido estimularlas con LPS de *A. actinomycetemcomitans* 29522 (200, 75, 25, 12, 7 y 1µg/mL) a dosis única durante 30 min a 37°C. La viabilidad celular fue evaluada por la conversión de calceína-AM a calceína (verde)

mediada por la enzima intracelular esterasa usando el kit comercial LIVE/DEAD viability/cytotoxicity (ThermoFisher Scientific, USA). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y de manera independiente. Las plaquetas sin estímulo fueron consideradas como control de supervivencia y todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

*7.3.4. Estudio piloto de estimulación con LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas*

Una vez transcurrieron las 24 horas de exposición reiterativa al LPS, se procede al montaje del co-cultivo con plaquetas humanas para lo cual proponemos dos modelos de co-cultivo con el objetivo de determinar a manera de estudio piloto el modelo a utilizar para las siguientes fases del proyecto.

Modelo 1: Células endoteliales estimuladas con LPS a dosis reiterativa. (Plaquetas no estimuladas con LPS).

Modelo 2: Estudio piloto de estimulación con LPS de *A. actinomycetemcomitans* en un modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas con LPS a dosis repetidas.

Tabla 1. Modelo Co-cultivo 1 y 2.

Modelo Co-cultivo 1	Descripción de la condición
HCAEC	Basal de cultivo HCAEC
HCAEC – LPS 1 ug/mL	Cultivo
HCAEC – LPS 3.5 ug/mL	Cultivo
HCAEC – LPS 7 ug/mL	Cultivo
Modelo Co-cultivo 2	
HCAEC + Plaqueta	Basal co-cultivo
HCAEC-LPS + Plaquetas- LPS 1 ug/mL	Co-cultivo
HCAEC – LPS + Plaquetas – LPS 3.5ug/mL	Co-cultivo
HCAEC – LPS + Plaquetas – LPS + 7 ug/mL	Co-cultivo
Plaqueta	Basal Cultivo

La preparación previa de las plaquetas consistió en lavados con Wash Buffer a pH 6.0 y tres series de centrifugación cada una a 3800 RPM por 15 minutos. Posteriormente se resuspendió en 1 mL de Buffer de re-suspensión a pH 7.4 y de esta manera obtener plaquetas aisladas o libres de plasma para luego activarlas a temperatura ambiente con cloruro de calcio a 2MM durante 45 minutos.

Posterior a toda la preparación de las plaquetas descrita anteriormente se procedió a realizar el montaje de co-cultivo 2 según diseño y modelo de estimulación descrito en la tabla anterior. Las plaquetas estimuladas (LPS 1, 3.5, 7 o Trombina 0.5 U) fueron incorporadas sobre la monocapa endotelial a una concentración final de 2×10^8 /ml y homogéneamente distribuidas favoreciendo el contacto directo con la monocapa por 1 hora en constante agitación. Adicionalmente verificamos la interacción y homogeneidad en la distribución del co-cultivo mediante observación directa al microscopio.

Después de 1 hora de co-cultivo se removieron las plaquetas mediante 2 lavados con PBS pH: 7.0 y el sobrenadante recolectado fue separado por centrifugación a 3800 RPM por 15

minutos. Una vez obtenido el pellet de plaquetas y la monocapa de HCAEC post-cocultivo, estas fueron lisadas ya sea mediante Buffer de lisis RIPA por 15 minutos en agitación e inhibidores de proteasas y fosfatasa o por Trizol® para la extracción de RNA total y posterior RT-qPCR. Respecto a los lisados celulares, extractos de RNA y a los sobrenadantes del co-cultivo, estos fueron almacenados a -80C° para su posterior procesamiento por citometría de flujo con el fin de evaluar la molécula de adhesión P-selectina y PAC como molécula de activación.

7.3.5. Determinación de moléculas de adhesión (P-selectina) y activación (PAC) en el modelo de co-cultivo estimulado con LPS de A. actinomycetemcomitans

Para determinar la expresión de los marcadores de activación plaquetaria y moléculas de adhesión en células HCAEC se realizó un co-cultivo de las células endoteliales y plaquetas humanas como se describió anteriormente. Cada tratamiento fue valorado en tres experimentos independientes.

Para el análisis de las plaquetas, 100 ul de cada muestra se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti CD26P y anti PAC marcados con FITC y PE respectivamente. Posteriormente fueron lavadas con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos y fueron analizadas mediante citometría de flujo (BD Accuri C6), de acuerdo con los parámetros de tamaño, complejidad e intensidad de fluorescencia para cada uno de los marcadores evaluados. Como control interno de la técnica y para la normalización de los resultados, se utilizaron células (estimuladas o no estimuladas dependiendo el ensayo) sin marcar.

7.3.6. Cuantificación de Tromboxano A (TXA) en el modelo de co-cultivo estimulado con LPS de A.actinomycetemcomitans

La determinación del Tromboxano A2 se realizó bajo el principio de ELISA competitiva mediante el kit Cayman Chemical 28tem #501020.

7.4. Plan de tabulación y análisis

Los datos se indicaron como medias más o menos la desviación estándar. Los datos se analizaron por ANOVA de doble vía para comparar pares de grupos seleccionados. Los datos al no presentar una distribución normal fueron analizados por el estadístico no paramétrico de Dunnett. El análisis estadístico se realizó con el programa informativo GraphPadPrism6. La probabilidad tenida en cuenta fue $P < 0.05$.

7.4.1. Hipótesis estadísticas (alterna y nula)

- H1: El Lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* induce activación y adhesión plaquetaria en el modelo de co-cultivo de HCAEC.
- H0: El lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* no induce activación, ni adhesión plaquetaria en un modelo de co-cultivo con HCAEC.

8. Consideraciones éticas

De acuerdo a las guías de buenas prácticas clínicas del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque y la resolución 008430 de 1993 este estudio se considera de riesgo menor al mínimo.

Todos los procedimientos que se realizarán en el presente proyecto tienen aprobación por parte del Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque. Se aprobó en la sesión extraordinaria de 3 de junio de 2014, Acta #011-2014 (anexo 2).

Obtención de plaquetas humanas: En concordancia con los artículos 15 y 16 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, la cual plantea la aplicación del consentimiento informado, el cual estará a cargo de la fundación Hematológica Colombiana, que cual nos proveerá las plaquetas humanas a partir de donantes voluntarios bajo el convenio firmado entre la fundación y la Universidad El Bosque (Anexo 1).

Tabla 2. Consideraciones Éticas

Requiere aval ético (marque con equis)				Nivel ético según resolución 008430 de 1993 (marque con equis solamente si considera que requiere aval ético)					
SI	X	NO		Investigación sin riesgo		Investigación con riesgo mínimo	X	Investigación con riesgo mayor que el mínimo	

8.1. Consentimiento informado

EN CUANTO AL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con base en el CONVENIO DE COOPERACIÓN INTERINSTITUCIONAL que se elaboró, expresamente se advirtió que en el **ANEXO CUATRO** se indicarían las condiciones legales que debería reunir el CONSENTIMIENTO INFORMADO; por lo cual, a continuación se precisan los siguientes aspectos:

1. La FUNDACIÓN HEMATOLÓGICA COLOMBIA ya cuenta con un formato de consentimiento informado, que al revisar con detenimiento ES TOTALMENTE ADECUADO Y PERTINENTE.
2. Aunque hacen faltan algunas complementaciones adicionales que a renglón seguido se indican, NO RESULTA VIABLE QUE SE FIRMEN DOS (2) CONSENTIMIENTOS sobre lo mismo, por lo que lo que se sugiere adicionar, incluyéndose o pegándolo a continuación del último renglón, dado que el sujeto sólo suscribirá una (1) vez, con la cobertura que se haya estipulado.
3. Así las cosas, se recomienda enriquecer el referido consentimiento con esta advertencia adicional:
“[...] Sin perjuicio de lo expuesto, expresamente manifiesto que de igual forma he sido debidamente informado sobre la eventualidad de que las muestras de sangre que se obtengan, puedan ser objeto de análisis, investigación o estudio tanto científico como académico, para lo cual la FUNDACIÓN HEMATOLÓGICA COLOMBIA podrá celebrar los convenios de cooperación que a bien estime, para llevar a cabo dicha finalidad a través de una Universidad Colombiana de reconocida trayectoria, teniendo en cuenta que los resultados que se concluyan serán publicados y divulgados de manera agregada, sin que tercero alguno pueda identificar o personalizar tales resultados con una muestra específica, ni muchos menos con el donante al que le corresponden; dado que se empleará el método de codificación recomendado para estos casos, preservando mi identidad, así como manteniendo la confidencialidad y reserva debida sobre mis datos sensibles. En consecuencia, he sido notificado del debido cumplimiento de las normas que regulan el HÁBEAS DATA que me compete, particularmente las Leyes Estatutarias 1266 de 2008 y 1581 de 2012; la Ley 1273 de 2009, el Decreto 1727 de 2009, el Decreto 1377 de 2013, las sentencias de la Corte Constitucional C-186/2008, C-1011/2008, C-748/2011 y C-540/2012, entre otras, junto con el Decreto Único 1074 de 2015 reglamentario parcialmente de la Ley 1581, así como la Circular Externa 02 del 3 de noviembre de 2015 de la Superintendencia de Industria y Comercio sobre bases de datos y su registro, de manera que conozco mis derechos, al igual que el procedimiento para consultar, presentar quejas o reclamos, obtener información o retirar libremente y en cualquier momento los datos suministrados, sin ninguna restricción, dando por terminado la autorización aquí concedida. Así las cosas, para estos últimos fines al igual que para los exclusivos efectos de la investigación en ciernes, los encargados de adelantar dichos estudios podrán ponerse en contacto conmigo, con la reserva, respeto y demás precauciones debidas, por lo que a continuación indico cómo me pueden ubicar. En señal de pleno conocimiento, conformidad, autorización y aceptación, lo suscribo a los ____ (____) días del mes de _____ del año ____ (____), en la ciudad de _____.”

9. Resultados

9.1. Fase analítica

9.1.1. Purificación y caracterización del LPS de *A. actinomycetemcomitans*

La caracterización del extracto de *A. actinomycetemcomitans* (*A.a*) fue determinado según el perfil electroforético. El quimiotipo del lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 se clasificó como tipo liso. La detección de proteínas contaminantes registró bandas para lipopolisacáridos comerciales con una masa cercana a 66 Kda, mientras que el lipopolisacárido obtenido para *A.a* después de la repurificación no presentó banda. La metodología implementada en este estudio se realizó utilizando diferentes técnicas previamente reportadas para la extracción, purificación y caracterización de LPS, una de ellas es el perfil electroforético. (Figura 6)

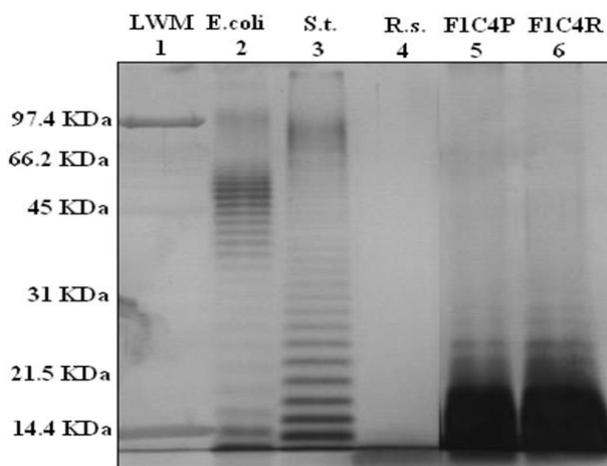


Figura 6. Perfil electroforético de lipopolisacáridos presentes en la fracción 1 del lote 4 purificado y repurificado LPS *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, tinción plata.

Se sembró 10 μ l en el carril 1, 15 μ l para los carriles 2 – 6. Carriles: 1. Marcador de bajo peso molecular, 2. Lipopolisacárido comercial de *Escherichia coli* 0111:B4 (InvivoGen cat.#tlrl-3pelps) (6 μ g/pozo). 3. Lipopolisacárido comercial de *Salmonella typhimurium* ATCC 7823 (Sigma cat.#L7261 lot # 68H404) (6 μ g/pozo), 4. Lipopolisacárido comercial de *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 (InvivoGen cat.#tlrl-rslps) (6 μ g/pozo), 5. Fracción 1 lote 4 purificado *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 (15 μ g/pozo), 6. Fracción 1 lote 4 repurificado *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 (15 μ g/pozo).

9.1.2. Viabilidad en HCAECs estimuladas con LPS de *A. actinomycetemcomitans*

Ninguna de las concentraciones de LPS de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 (1.0 3.5, y 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) afectaron la viabilidad celular. Este resultado refleja la integridad celular endotelial con porcentajes de supervivencia por encima del 99% en comparación con el control (células sin estimular). El Tritón al 1% produjo el 100% de muerte celular siendo nuestro control positivo de muerte ($p \leq 0.05$), (Figura 7).

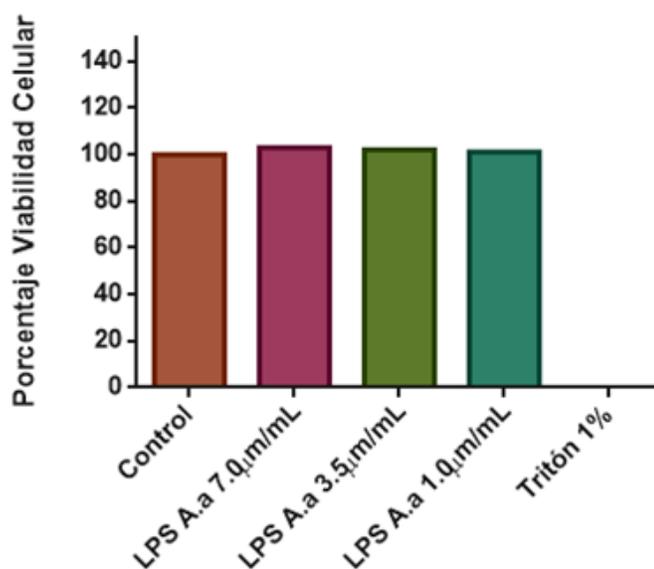


Figura 7. Viabilidad de células endoteliales HCAEC estimuladas con LPS de *A. Actinomycetemcomitans* a dosis repetidas. (1.0, 3,5 y 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular como control de viabilidad. Se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. Cada barra representa la media en porcentaje \pm e.s.m. de tres experimentos independientes por triplicado para cada tratamiento ($n=3$).

9.1.3. Viabilidad y toxicidad de plaquetas humanas estimuladas con LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, microscopia de fluorescencia

La viabilidad celular fue evaluada por la conversión de calceína-AM a calceína (verde) mediada por la enzima intracelular esterasa mediante microscopía de fluorescencia, donde se evidencia claramente el aumento de agregación plaquetaria y se descarta la muerte celular (Figura 8).

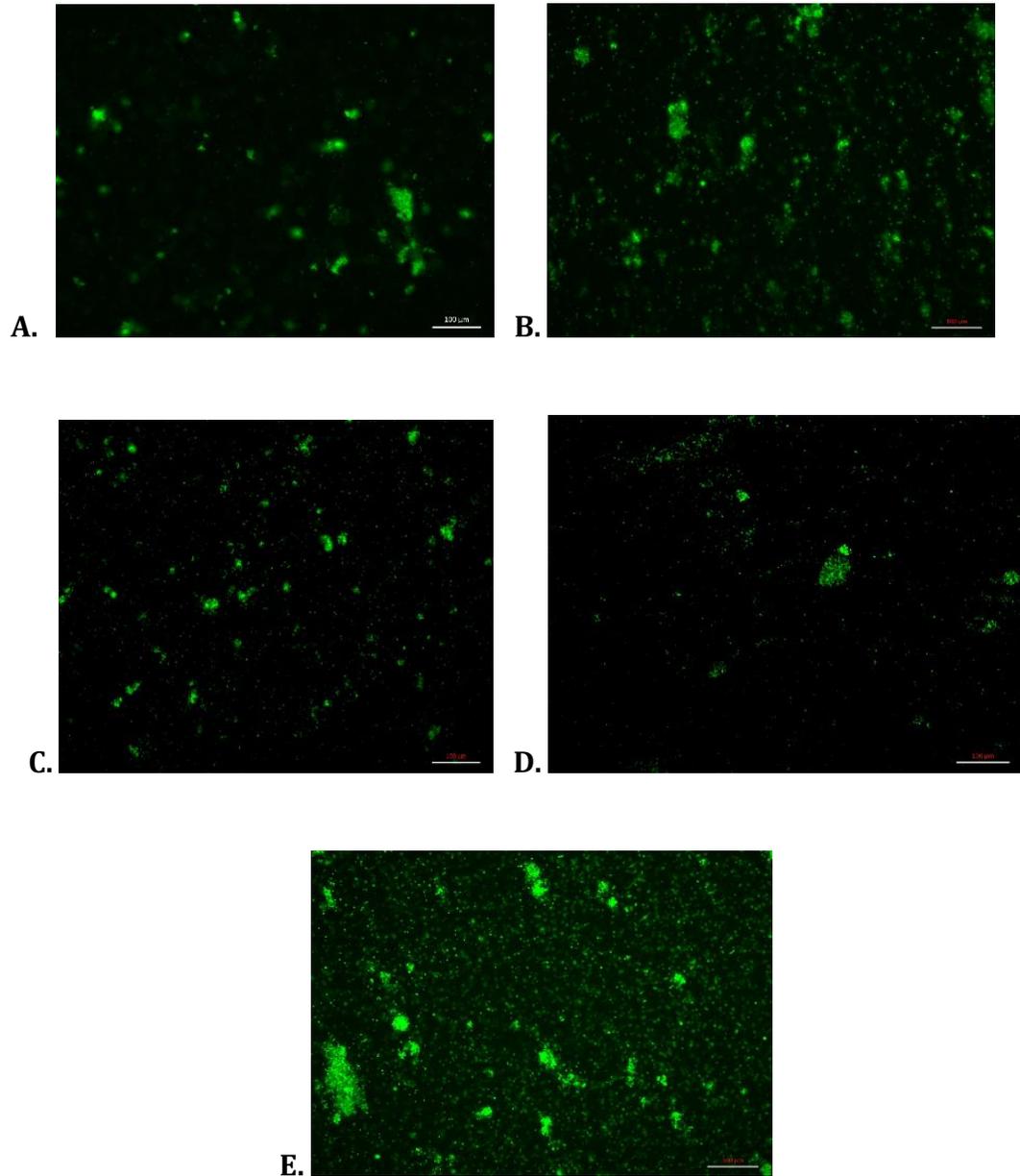


Figura 8. Viabilidad y toxicidad de plaquetas humanas estimuladas con LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, microscopía de fluorescencia. Plaquetas en suspensión en láminas portaobjetos estimuladas a diferentes concentraciones de LPS A) [100 μ g/mL], B) [75 μ g/mL], C) [25 μ g/mL], D) [7.0 μ g/mL], E)

[1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. La viabilidad celular fue evaluada por la conversión de calceína-AM a calceína (verde) mediada por la enzima intracelular esterasa mediante microscopía de fluorescencia.

9.1.4. Citotoxicidad plaquetaria estimulada con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Las plaquetas al ser estimuladas con LPS de *A. actinomycetemcomitans*; nos permitió observar que a la máxima concentración evaluada de LPS (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induce muerte celular lo que sugiere que se afecta su integridad ya que presentan una baja viabilidad con un porcentaje de 1.8 % con respecto a los otros tratamiento; además muestra datos similares al control de muerte (triton 1%) (Figura 9).

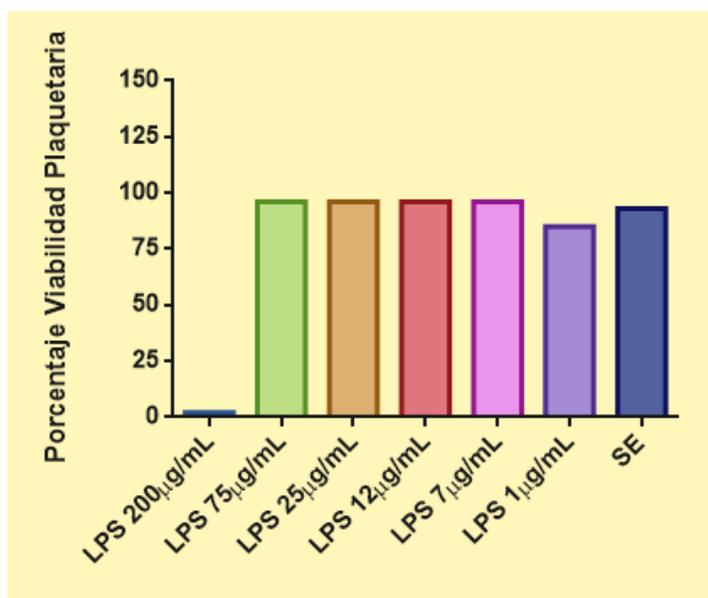


Figura 9. Citotoxicidad plaquetaria estimulada con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Las plaquetas fueron estimuladas con LPS por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular como control de viabilidad. Se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. *Cada barra representa la media en porcentaje \pm e.s.m. de tres experimentos independientes por triplicado para cada tratamiento ($n=3$).

9.1.5. Viabilidad plaquetaria y celular en modelo de co-cultivo estimulada con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

En la siguiente gráfica corroboramos como se altera la viabilidad de las plaquetas en concentraciones de 200 ug/ml de LPS de *A. actinomycetemcomitans* ya que obtuvo un porcentaje bajo de viabilidad (17,9 %) en comparación con el porcentaje de viabilidad presentado en el resto de las concentraciones de LPS, de tal modo que dicha concentración no es recomendable utilizar en estudios posteriores (Figura 10).

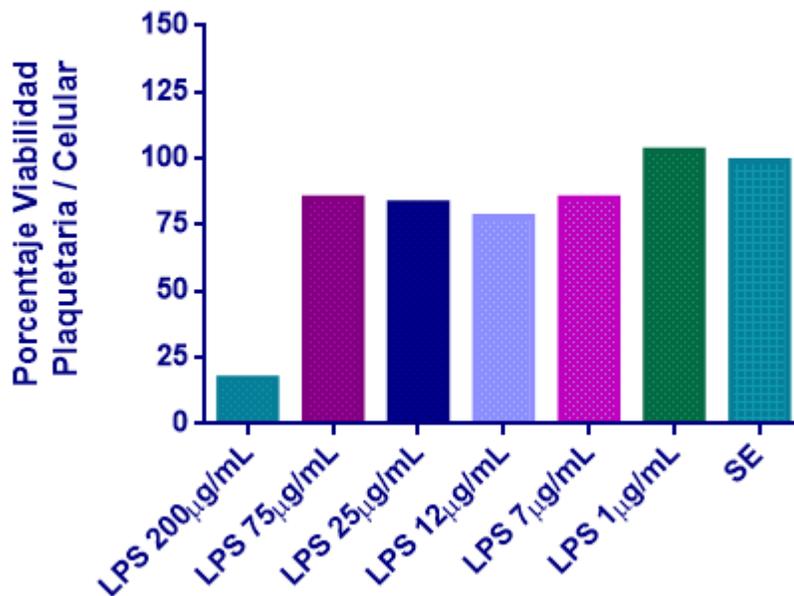


Figura 10. Viabilidad plaquetaria y celular en modelo de co-cultivo estimulada con lipopolisacárido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Las plaquetas y células HCAEC fueron estimuladas con LPS por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular como control de viabilidad. Se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. *Cada barra representa la media en porcentaje \pm e.s.m. de tres experimentos independientes por triplicado para cada tratamiento ($n=3$).

9.1.6. Determinación del modelo de co-cultivo para los ensayos de adhesión y activación plaquetaria.

Con respecto a los experimentos realizados del estudio piloto de co-cultivo, evaluando la expresión de COX-2 en plaquetas humanas y HCAEC estimuladas con LPS de *A. actinomycetemcomitans*; utilizando como control células y plaquetas sin estímulo se pudo demostrar que la expresión de COX-2 presenta valores menores al control sin estímulo (1) en protocolo 1 a ambas concentraciones de LPS 7.0 y 3.5 $\mu\text{g/mL}$ (0,58 y 0,38 respectivamente), mientras que en protocolo 2 se presentó un aumento de la expresión de COX-2 3,1 y 3,3 veces a las concentraciones de 7.0 y 3,5 $\mu\text{g/mL}$ en comparación al control ($p \leq 0,05$) (Figura 11).

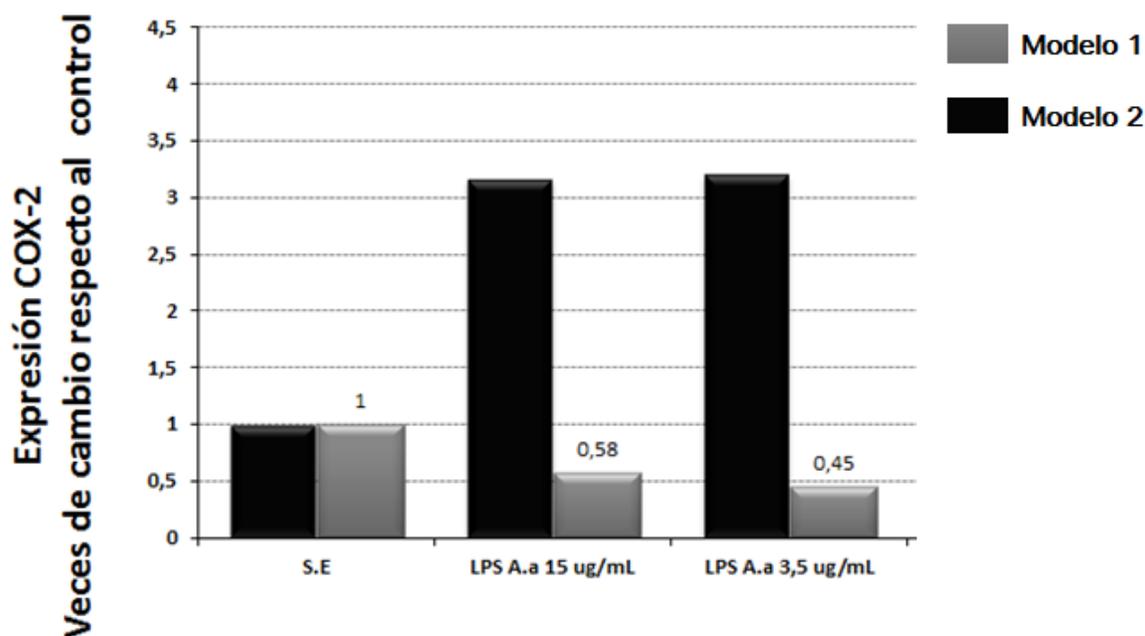


Figura 11. Expresión de los genes de COX-2 en células HCAEC ($n=2$ por tratamiento). Se realizó la evaluación del RNAm en HCAEC estimuladas con LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de acuerdo a los tratamientos preestablecidos. Se usó la técnica de RT-PCR SYBR Green para la cuantificación del RNAm. Los resultados muestran las veces de cambio de la expresión del receptor con respecto al grupo control sin estímulo. Se realizaron experimentos independientes por duplicado.

9.1.7. Activación de PAC y P/E-selectina en células HCAEC y Plaquetas humanas estimulados con LPS y bacteria completa de *A. actinomycetemcomitans*

EL LPS *A. actinomycetemcomitans* a las diferentes concentraciones evaluadas (1.0 µg/DA, 1.0, 3.5, 7.0 µg/DC) tanto dosis aguda (DA) como dosis crónica (DC) no induce un aumento en la expresión de P-selectina en plaquetas en relación al control SE (1,3%) (Figura 12).

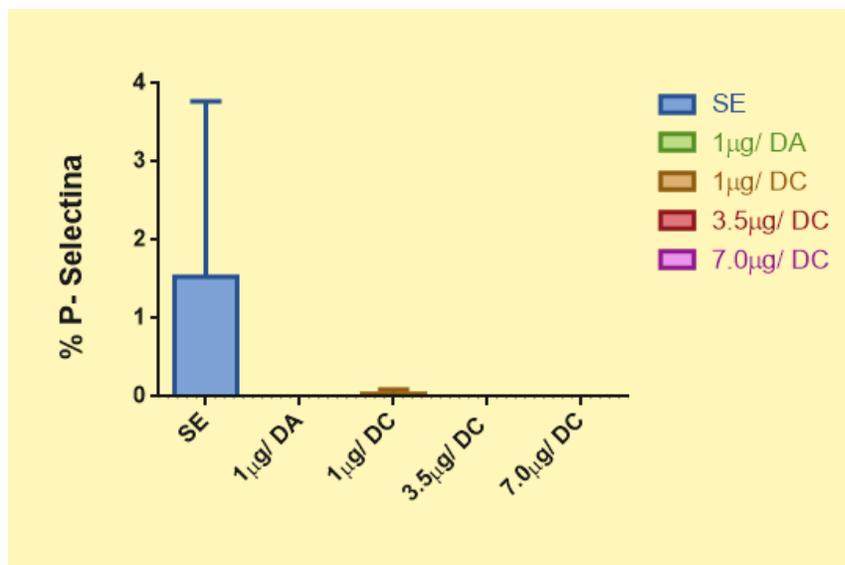


Figura 12. Porcentaje de expresión de P- selectina en plaquetas. selectina en plaquetas humanas estimuladas con LPS (1.0, 3,5 y 7.0 µg/mL) a dosis única (DA) y repetida (DC) . Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; *p<0,05 con respecto control plaquetas y co-cultivo sin estimular.

9.1.8. Porcentaje de expresión de P-selectina en células endoteliales HCAEC

AL estimular las células endoteliales HCAEC con LPS de *A. actinomycetemcomitans* a diferentes concentraciones (1µg/DA, 1, 3.5, 7 µg/DC), se determinó que la expresión de P-selectina es mayor a la dosis de 7 µg/DC con respecto al SE. El (*) representa la mayor significancia estadística (P >0.05) (Figura 13).

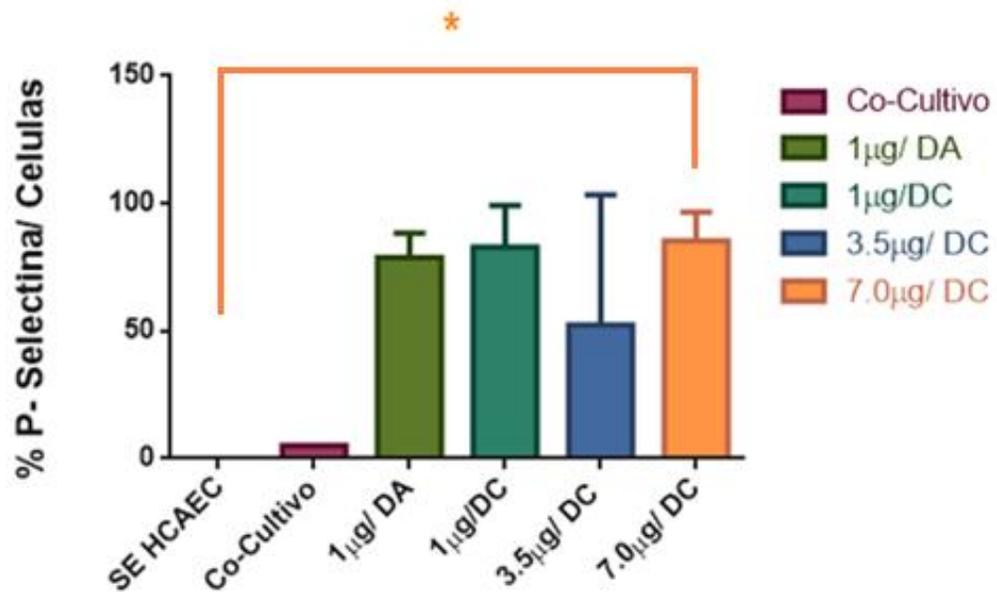


Figura 13. Porcentaje de expresión de P-selectina en células endoteliales HCAEC. Expresión de P-selectina en células HCAEC estimuladas con LPS (1.0, 3,5 y 7.0 µg/mL) y BC MOi: 100 a dosis única y repetida. Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; *p<0,05 con respecto control HCAEC y co-cultivo sin estimular

9.1.9. Porcentaje de expresión de complejo de activación plaquetaria (PAC).

Con respecto a la expresión del receptor activador plaquetario (PAC) no se presentó modificaciones en el porcentaje de su expresión con ninguno de los tratamientos evaluados en comparación al SE ($P > 0.05$) (Figura 14).

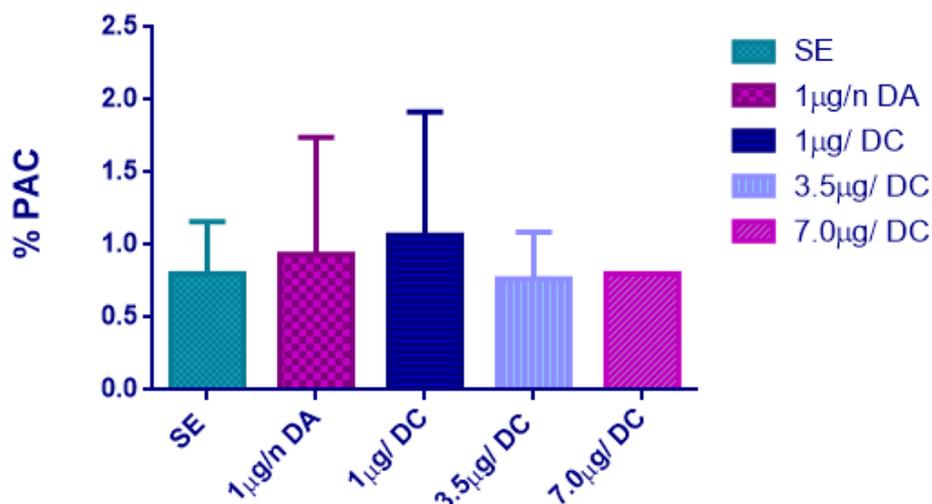


Figura 14. Porcentaje de expresión de complejo de activación plaquetaria (PAC). Expresión de PAC en plaquetas humanas estimuladas con LPS (1.0, 3.5 y 7.0 µg/mL) a dosis única y repetida. Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; *p<0,05 con respecto control plaquetas y co-cultivo sin estimular.

9.1.10. Cuantificación de niveles de Tromboxano A2 en el modelo de co-cultivo de HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con LPS y bacteria completa de *A. actinomycetemcomitans*.

Con respecto a los niveles de tromboxano A2, nuestros resultados permiten demostrar que hay un aumento de la producción de esta molécula en el modelo de co-cultivo estimulado con el LPS de *A. actinomycetemcomitans* a las tres concentraciones evaluadas en comparación con los controles: células sin estimular 1,6 pg/mL y co-cultivo 1,5 pg/mL. Al comparar la administración a dosis única y repetida los valores de tromboxano A2 fueron muy similares DA (764 pg/mL) y DC (783 pg/mL), a la concentración de 3,5 µg/mL se presentó el mayor incremento de 1266 pg/mL y se disminuye a 532 pg/mL cuando se utilizó a concentración de LPS de 7.0 µg/mL (p≤0,05) (Figura 15).

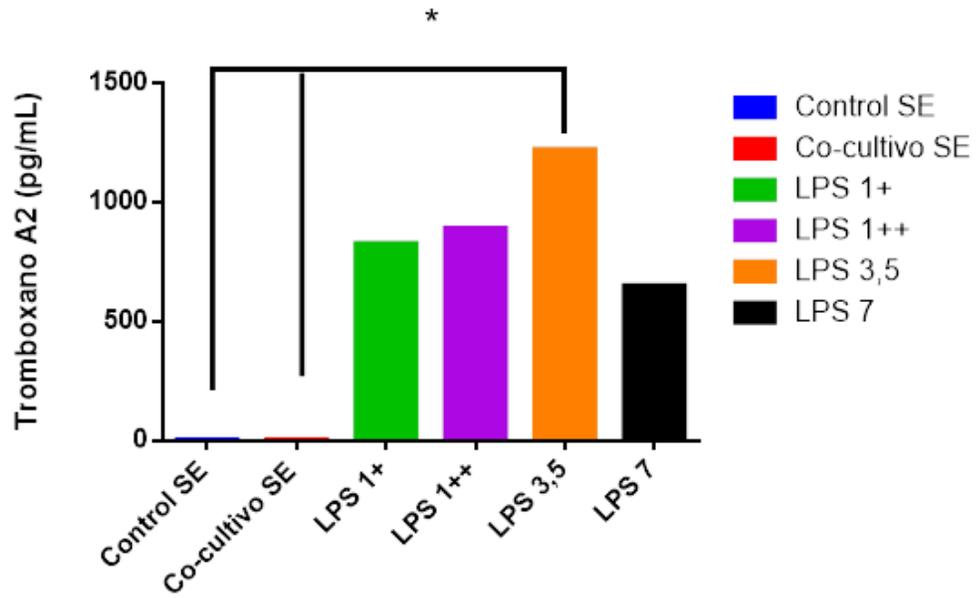


Figura 15. Expresión tromboxano A2 en co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con LPS (1.0, 3,5 y 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a dosis única y repetida. Cada barra representa el promedio e.s.m. de $n=3$; $*p<0,05$ con respecto control HCAEC y co-cultivo sin estimular.

10. Discusión

La exposición bacteriana sistémica en individuos con enfermedad periodontal se asocia con enfermedad cardiovascular coronaria y aterogénesis temprana con un cociente de probabilidad de 1.74 (intervalo de confianza de 95% [95%CI] 1.32 – 2.34; $P > .0001$) (Mustapha *et al.*, 2007).

Un deficiente tratamiento periodontal aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares; además en pacientes con periodontitis ocurren bacteriemias y endotoxemias después de masticar, cepillar o recibir dicho tratamiento periodontal (factores inflamatorios locales) que llegan a inducir una respuesta proinflamatoria crónica y sistémica (Geerts *et al.*, 2002).

Sin embargo, estos estímulos inflamatorios locales (que se filtran de los tejidos periodontales infectados a la circulación) o los estímulos inflamatorios sistémicos (resultantes de las respuestas inmunes a la bacteremia asociada a la periodontitis) pueden inducir la activación de células endoteliales y plaquetarias. Además, la interacción directa entre patógenos y células endoteliales podría contribuir al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (L. Li *et al.*, 2002).

Se han identificado microorganismos que mediante la invasión directa al torrente sanguíneo contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas y afecciones cardiovasculares potenciales. Estudios in-vitro realizados han demostrado que los factores de virulencia de las bacterias periodontales patógenas como el LPS sumados a los mecanismos de acción de estas inducen disfunción endotelial y su relación con la aterosclerosis (Howell *et al.*, 2001), (Gualtero *et al.*, 2018).

En la aterosclerosis dada por la disfunción endotelial ocasionada a su vez por la diferenciación de macrófagos y conversión en células espumosas, se ha observado que junto con el LPS de A.a y lipoproteínas de baja densidad en modelos de cultivo de células

endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y células aórticas humanas (HCAEC), inducen la expresión de citoquinas pro inflamatorias factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquina-6 (IL-6) y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Libby *et al.*, 2013).

Anteriormente la disfunción endotelial, se asocia con un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión (ICAM/CD54, PECAM/CD31, VCAM/CD106, P-Selectina), así como la activación de las plaquetas que se pueden generar con la periodontitis; debido a esto la importancia de nuestro estudio fue evaluar los niveles y expresión de moléculas coadyuvantes como son PAC, tromboxano A2 (TXB₂) y P-Selectina (Lakio *et al.*, 2006).

La P-selectina desempeña un papel fundamental en la inflamación y el desarrollo de enfermedades trombóticas y cardiovasculares. En consecuencia, los niveles elevados de P-selectina se encuentran en la periodontitis y (otras formas de) enfermedades inflamatorias, ésta podría contribuir a la gravedad de dichas enfermedades al mejorar el reclutamiento de leucocitos a la lesión vascular y, por lo tanto, promover la progresión de la enfermedad (Woollard *et al.*, 2006).

Es importante destacar que estas afirmaciones están correlacionadas con los resultados obtenidos en el presente estudio ya que los datos obtenidos en cuanto a la expresión de P-selectina en células endoteliales son estadísticamente significativos para la concentración de 7.0 μ g DC de LPS de A. a lo que es fundamental para la agregación plaquetaria y como consecuencia de desarrollar enfermedades cerebrovasculares.

11. Conclusiones

- ❖ La respuesta endotelial dada por el lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* puede ser alterada por el número o concentraciones de dosis a la que expone el endotelio, confirmando que la exposición *in vitro* a dosis repetidas con la endotoxina de este periodontopatógeno puede llevar a un mejor entendimiento de la disfunción endotelial, la activación y/o adhesión de moléculas pro inflamatorias inducidas por esta bacteria.
- ❖ El diseño del modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas permitió determinar la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina en células endoteliales estimuladas con LPS de *A. actinomycetemcomitans* a la concentración de 7 µg/mL, indicando que este periodontopatógeno juega un papel importante en la interacción entre célula endotelial y plaqueta lo que conlleva a la producción y progresión de los procesos aterotromboticos.
- ❖ En el modelo de co-cultivo de plaquetas humanas y HCAEC se determinó que el LPS de *A. actinomycetemcomitans* induce un aumento de los niveles de tromboxano A2, lo que indica que esta endotoxina puede conllevar a la activación, adhesión y agregación plaquetaria mediante la vía asociada a tromboxano A2.

12. Referencias

1. Alonso R. A., Hernández G. M., and R. M. P. Pérez Gómez. Evidencias científicas de la relación entre periodontitis y enfermedades cardiovasculares. *Avances en periodoncia e implantología oral* 20.3 (2008): 173-181
2. Bahekar, Amol Ashok, et al. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *American heart journal* 154.5 (2007): 830-837.
3. Barry AK, Wang N, Leckband DE. Local mechanotransduction of cadherin VE triggers the long-term remodeling of endothelial monolayers. *J Cell Sci.* (2015); 128: 1341-1351.
4. Bascones A., & Figuero E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral* (2005):17(3),111-118
5. Beca T., Hernández G., Bascones A. AINEs como tratamiento coadyuvante de la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia.* (2017): 101-113.
6. Brigido J., et al. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 19.2 (2014): e184.
7. Calle M., Ángel P., Duque A., Giraldo A. Enfermedad periodontal y su relación con las enfermedades cardiovasculares. *Rev. CES Odont.* (2012);25(1) 82-91
8. Cruz S., et al. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología* (2017):54,1 84-99
9. De Nardin, E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Annals of Periodontology* 6.1. (2001): 30-40.
10. Delgado L., Echeverria J., Berini L., Gay C. La periodontitis como factor de riesgo en los pacientes con cardiopatía isquémica. *Medicina oral, Patología oral y Cirugía bucal.* (2004); Vol. 9, 125-137
11. Dietrich, T., et al. The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of periodontology* 84.4-s (2013): S70-S84.

12. Fuertes L., Del Valle O., Justo M., Lemus L., Fernández J. Evidencias que demuestran la relación entre las enfermedades periodontales y las cardiovasculares. *Rev haban cienc méd.* (2008).
13. Geerts S., et al. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *Journal of periodontology* (2002): 73.1 73-78.
14. Glurich, I., et al. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9.2 (2002): 425-432.
15. Gualtero D, et al. Purification and characterization of lipopolysaccharide from *Eikenella corrodens* 23834 and *Porphyromonas gingivalis* W83. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16.1 (2014): 34-44.
16. Gualtero, D, Lafaurie, G. I., & Fontanilla, M. R. Two-dimensional and three-dimensional models for studying atherosclerosis pathogenesis induced by periodontopathogenic microorganisms. *Molecular oral microbiology*, (2018). 33(1), 29-37.
17. Hansson G. Inflamación, aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria. *N Engl J Med.* (2005); 352: 1685 - 1695.
18. Haynes W., Stanford C. Periodontal disease and atherosclerosis from dental to arterial plaque. *Arterioscler thromb Vasc Biol.* (2003); 23:1309- 1311
19. Henderson B., Ward J., Ready D. *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: a triple periodontopathogen A *? *Periodontol* 2000 2010; 54: 78-105; PMID: 20712635
20. Hirschfeld M., Weis J., Toshchakov V., Salkowski C., Cody M., Ward D, et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* (2001 mar); 69(3):1477-1482.
21. Howell T, et al. Periodontal disease and risk of subsequent cardiovascular disease in US male physicians. *Journal of the American College of Cardiology* (2001): 37.2 445-450.
22. Iwai, T. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *Journal of periodontal research* 44.6 (2009): 689-694.
23. Jiménez G. & Machuca G. Cardiopatías y enfermedades periodontales: ¿Existen evidencias de asociación? *Medicina oral, Patología oral y cirugía bucal.* 2005; Vol. 10, 215-.220

24. Johson R., McGregor J., Taylor P., Poston R. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* (1994); 144:952-61.
25. Josphipura, K. J., et al. Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. *Journal of dental research* 83.2 (2004): 151-155.
26. Katz J, Chaushu G, Sharabi Y. On the association between hypercholesterolemia, cardiovascular disease and severe periodontal disease. *J Clin Periodontol* (2001 Sep); 28(9):865-868.
27. Kinane D. Periodontal diseases contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. *Ann Periodontol* (1998 Jul);3(1):142-150.
28. Kinane, D. et al. Bacteraemia following periodontal procedures. *Journal of clinical periodontology* 32.7 (2005): 708-713.
29. King E., Tatum H. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Hemophilus aphrophilus*. *J Infect Dis* (1962 Sep-Oct); 111:85-94.
30. Kittichotirat W., Bumgarner R., Asikainen S., Chen C. Identification of the pangenome and its components in 14 different strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by comparative genomic analysis. *PloS one* 2011; 6: e22420; PMID: 21811606
31. Woollard KJ, Kling D., Kulkarni S., Dart AM, Jackson S., Chin J. Laselectina P soluble *Circ Res*, 98 (2006) , pp. 149 - 156.
32. L. Li, E. Messas, El Batista Jr., RA Levine, S. Amar *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous murine model apolipoprotein E deficient *E Circulation*, 105 (2002), pp. 861 – 867
33. Lafaurie G, Mayorga-Fayad I, Torres M, et al. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and straightening of the root. *J Clin Periodontol.* (2007); 34: 873-879.
34. Lakio L, et al. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of endotoxin research* 12.1 (2006): 57-64.
35. Libby P, Andrew H, et al. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity* 38.6 (2013): 1092-1104.

36. Lockhart, Peter B., et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 125.20 (2012): 2520-2544.
37. Loos, Bruno G., et al. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of periodontology* 71.10 (2000): 1528-1534.
38. Lowe, Gordon DO. The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular disease: an overview. *Annals of periodontology* 6.1 (2001): 1-8.
39. Mujica C., et al. Co-detección de patógenos periodontales en pacientes chilenos con periodontitis crónica. *Clínica de Periodoncia, Implantología y rehabilitación oral* 3.3 (2010): 118-122
40. Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M , et al. Marcadores de la exposición bacteriana sistémica en la enfermedad periodontal y el riesgo de enfermedad cardiovascular: una revisión sistemática y un metanálisis . *J Periodontol.* (2007); 78: 2289 - 2302.
41. Nakamura N, Yoshida M, Umeda M, Huang Y, Kitajima S, Inoue Y, et al. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* (2008 Jan);196(1):59-67.
42. Offenbacher, Steven, et al. Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *Journal of periodontal research* 34.7 (1999): 346-352.
43. Organización Mundial de La Salud (internet). Enfermedades cardiovasculares. (2017) Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
44. Organización Mundial de la Salud (internet.salud bucodental);(2012) [internet. Ref online] seis pantallas. Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
45. Leng W-D; et al. Periodontal disease and risk of coronary heart disease: An updated meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cardiology* (2015):201 469-472
46. Papapanagiotou D, Nicu E, et al. Periodontitis is associated with platelet activation Atherosclerosis, 202 (2009), p. 605 - 611

47. Paquette, David W., Nadine Brodala, and Timothy C. Nichols. Cardiovascular disease, inflammation, and periodontal infection. *Periodontology 2000* 44.1 (2007): 113-126.
48. Peña M., et al. La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. *Revista Cubana de Estomatología* (2008):45.1 0-0
49. Persson, Gösta Rutger, and Rigmor Elisabeth Persson. Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *Journal of clinical periodontology* 35 (2008): 362-379.
50. Rojas N. El lipopolisacárido bacteriano: Una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. Costa Rica: Universidad de Costa Rica (1995).
51. Romero S, and Iregui C. Lipopolysaccharide. *Revista de Medicina Veterinaria* (2010): 19 37-45.
52. Rurenga P, Raangs E, Singadji Z, Wekema-Mulder G, Veloo A, van Winkelhoff A. Evaluation of three selective media for isolation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* (2013 Oct);48(5):549-552.
53. Serrano J., et al. Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. *Periodoncia y Osteointegración* (2008): 18.2 109-115.
54. Sfyroeras G., et al. Association between periodontal disease and stroke. *Journal Vascular Surgery* (2012):55.4 1178-1184
55. Socransky S., et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* (1998): 25(2):134-144
56. Stoll L., Denning G., Weintraub N. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004 Dec);24(12):2227-2236.
57. Takada K., Saito M., Tsuzukibashi O., Kawashima Y., Ishida S., Hirasawa M. Caracterización de un nuevo serotipo g aislado de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol* (2010); 25: 200-6; PMID: 20536747
58. Takeshi T., Keisuke N., Takaaki I., Makoto Y., Tatsuji N. Involvement of adhesion molecule in in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *Journal of periodontal research*. (2010); 45(4), 550-556.

59. Teeuw W., et al. Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* (2014); 41.1 70-79
60. Tonetti, Maurizio S., et al. "Treatment of periodontitis and endothelial function." *New England Journal of Medicine* 356.9 (2007): 911-920.
61. Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses WB., Dejana E., Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. Un complejo mecanosensorial que media la respuesta de las células endoteliales al esfuerzo de cizallamiento del fluido. *Naturaleza*. (2005); 437 : 426-431.
62. Vernal R., Leon R., Herrera D., Garcia J., Silva, Sanz M. Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*. (2008 Dec);43(6):689-697.
63. World Health Organization. *The World health report: 2004: changing history*. (2004).
64. Zhang J., Patel JM., Li YD., bloque ER. Las citoquinas proinflamatorias regulan por disminución la expresión génica y la actividad de la sintasa de óxido nítrico constitutiva en las células endoteliales de la arteria pulmonar porcina. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. (1997); 96: 71-87.

13. Anexos

Anexo 1. Carta de convenio entre la fundación Hematológica Colombia y Universidad El Bosque

CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA INTERINSTITUCIONAL CELEBRADO

ENTRE LA

FUNDACION HEMATOLÓGICA COLOMBIA Y LA UNIVERSIDAD EL BOSQUE

Entre los suscritos, a saber: Por una parte, **MÓNICA PATRICIA RESTREPO SIERRA**, mayor de edad, domiciliada en Bogotá D.C., identificada con la cédula de ciudadanía número 51.891.539 de Bogotá, quien dada su calidad de Presidente, obra como Representante Legal de la **FUNDACIÓN HEMATOLÓGICA COLOMBIA**, entidad privada sin ánimo de lucro, con personería jurídica reconocida mediante Resolución No. 55 del quince (15) de enero del año dos mil dos (2002) proferida por la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C., con domicilio en dicha ciudad, estando debidamente facultada para celebrar el presente convenio, de acuerdo con el certificado de existencia y representación legal expedido por la Cámara de Comercio, cuya copia se adjunta (**ANEXO UNO**), parte que en adelante y para los efectos de este negocio jurídico se denominará **LA FUNDACIÓN**; y, por la otra, **RAFAEL SÁNCHEZ PARÍS**, también mayor de edad, domiciliado en esta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 80.410.714 de Bogotá, quien dada su calidad de Rector, obra como Representante Legal de la **UNIVERSIDAD EL BOSQUE**, institución de educación Superior, sin ánimo de lucro, con personería jurídica otorgada mediante Resolución No. 11153 del cuatro (4) de agosto de 1978 y reconocida institucionalmente como Universidad mediante Resolución No. 327 del cinco (5) de febrero de 1997, ambas expedidas por el Ministerio de Educación Nacional, estando debidamente autorizado para estos propósitos, todo lo cual consta en el respectivo certificado de existencia y representación legal cuya copia también se adjunta (**ANEXO DOS**), parte que en adelante se denominará **LA UNIVERSIDAD**; se ha celebrado el presente **CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA INTERINSTITUCIONAL**, que se regirá por las cláusulas que se indican más adelante, previas las siguientes

CONSIDERACIONES

PRIMERA: Que **LA FUNDACIÓN** tiene dentro de sus objetivos ejecutar proyectos relacionados con la salud en todas sus fases, bien sea directamente o en asocio con otras entidades.

SEGUNDA: Que dentro de los propósitos fundamentales de **LA UNIVERSIDAD** se encuentra la generación, transformación y transmisión de conocimiento, lo cual se refleja en su Política de Investigación, por conducto de la Vicerrectoría correspondiente, buscando contribuir al desarrollo científico y tecnológico, mediante la producción de saberes especializados y/o técnicos, junto con la investigación, innovación, transferencia y apropiación de tecnologías, metodologías, adaptaciones y/o creaciones dirigidas al mejoramiento de las condiciones de salud, bienestar y productividad de la población colombiana.

TERCERA: Que ambas partes se encuentran en capacidad de aunar esfuerzos, aprovechando las fortalezas que posee cada una, a la vez que compensan sus propias debilidades, gracias a la cooperación recíproca que pretenden adelantar mediante el perfeccionamiento del presente convenio, el cual lo entienden como un **NEGOCIO**



**CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA INTERINSTITUCIONAL CELEBRADO
ENTRE LA
FUNDACION HEMATOLÓGICA COLOMBIA Y LA UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

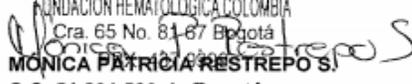
DÉCIMA: MODIFICACIONES AL CONVENIO E INTEGRALIDAD.- Las partes han acordado como requisito para la existencia y perfeccionamiento de este convenio, que sea plasmado por escrito debidamente firmado, siendo un formalismo voluntario concertado. De ahí que, cualquier eventual modificación al mismo, para su existencia, deberá observar idéntica solemnidad; es decir, que tendrá que acordarse previamente y ser plasmada en el respectivo OTROSÍ.

Se deja presente que este negocio jurídico junto con sus anexos, constituyen el marco jurídico convenido, regulando íntegramente la materia objeto del mismo, reemplazando cualquier otro acuerdo previo que se hubiere llevado a cabo entre las partes sobre el mismo tema.

DÉCIMO PRIMERA: CESIÓN Y SUBCONTRATACIÓN.- Ninguna de las partes podrá ceder total o parcialmente la posición contractual que ostenta en el presente negocio jurídico, así como tampoco podrá subcontratar las obligaciones que le competen ni ceder los derechos que se derivan, sin la previa autorización escrita de la otra parte; por cuanto ambas entienden y aceptan que este convenio se celebra en razón a la calidad y experticia de los sujetos, siendo por tanto *intuitu personae*.

En señal de entendimiento, conformidad y aceptación, se suscribe en Bogotá D.C., a los ~~veintiocho~~ días del mes de Abril del año dos mil diez y seis (2016), en dos (2) ejemplares del mismo valor y contenido con destino a cada una de las partes.

LA FUNDACIÓN

FUNDACION HEMATOLOGICA COLOMBIA
Cra. 65 No. 81-87 Bogotá

MÓNICA PATRICIA RESTREPO S.
C.C. 51.891.539 de Bogotá
**PRESIDENTE
FUNDACIÓN HEMATOLÓGICA
COLOMBIA**

LA UNIVERSIDAD


UNIVERSIDAD
EL BOSQUE

RAFAEL SÁNCHEZ PARIBON
C.C. 80.410.714 de Bogotá
**RECTOR
UNIVERSIDAD EL BOSQUE**



Anexo 2. Acta 0011 del 04 Junio 2014, aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque



COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD EL BOSQUE

MIEMBROS

MÓNICA RIVA GUTIÉRREZ
Psicóloga MSc.
Experta en Metodología de la Investigación
Presidenta

MARIA CRISTINA MEJÍA G.
Psicóloga
Representante de la Comunidad
Secretaria Ejecutiva

NADIA YADIRA CASTAÑEDA G
MSc. cPhD.
Lic. Biología y Química
Investigadora

NOHORA JOYA RAMÍREZ
Psicóloga MS. cPhD.
Experta en Bioética

BORIS JULIÁN PINTO B.
Médico MSc.
Experto en Bioética

JAIRO ANDRÉS MARTÍNEZ J.
Médico MSc.
Farmacólogo

LILIANA OVIEDO ALBAN
Psicóloga MSc.
Representante de la Comunidad

ABELARDO LEAL HERNÁNDEZ
Abogado Mc. cPhD.
Abogado

OSCAR RODRÍGUEZ AGUIRRE
MSc. PhD.
Experto en Metodología de la Investigación

Bogotá, D.C., 4 de Junio de 2014

Doctoras
Gloria Lafaurie Villamil
Diana Marcela Buitrago Ramírez
Grupo de Investigación UIBO
Facultad de Odontología
Universidad El Bosque
Ciudad

Protocolo: "Evaluación *in vitro* e *in vivo* del Efecto de los Polifenoles: Ácido Cafeico y Ácido Clorogénico sobre la Disfunción Endotelial y Adhesión Plaquetaria Inducida por el Lipopolisacárido de *P. Gingivalis*".

Investigadoras Principales: Dra. Gloria Inés Lafaurie
Dra. Diana Marcela Buitrago Ramírez.

Respetadas Doctoras:

Estamos informando que el Comité Institucional de Ética en Investigaciones, de la Universidad El Bosque, en la sesión extraordinaria del 3 de Junio de 2014, Acta #011-2014, revisó las correcciones del proyecto de referencia y se aprueba, ya que cumple ya que cumple con los requisitos éticos.

Atentamente,

MÓNICA RIVA GUTIÉRREZ
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigaciones



copia: **Dr. MIGUEL OTERO CADENA**
Vicerrectoría de Investigaciones

ACUERDO No. 11310 DE 2012

Por el cual se autorizan los nombramientos para el Comité de Ética Institucional de Investigación de la Universidad El Bosque, para el periodo comprendido entre el 1ro. de septiembre de 2012 y el 31 agosto de 2014.

El Consejo Directivo, en uso de las atribuciones legales que le confiere el Estatuto de la Universidad El Bosque, en su sesión ordinaria del día 29 de agosto de 2012, acta 995, y

CONSIDERANDO

Que el Reglamento del Comité de Ética de la Investigación, en su artículo 1ro, establece que los miembros del Comité deben ser nombrados por el Consejo Directivo.

Que la selección de los candidatos se realizó mediante convocatoria pública externa e interna.

Que la comisión nombrada por el Consejo Directivo, revisó y analizó las hojas de vida que se recibieron en la convocatoria para constituir los miembros del comité y decidió ratificar por un periodo de dos años a los siguientes miembros: JORGE ARI NORIEGA ALVARADO, NADIA YADIRA CASTAÑEDA GARCÍA, BORIS JULIÁN PINTO BUSTAMANTE, LILIANA OVIEDO ALBÁN, JAIRO ANDRÉS MARTÍNEZ JIMÉNEZ, MARÍA CRISTINA MEJÍA GAVILANES, MÓNICA RIVA GUTIÉRREZ y NOHORA STELLA JOYA RAMÍREZ y nombrar al Dr. ABELARDO LEAL HERNÁNDEZ - Abogado.

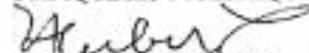
ACUERDA

ARTICULO PRIMERO. Autorizar los siguientes nombramientos para el Comité de Ética Institucional de Investigación de la Universidad El Bosque, para el periodo comprendido entre el 1ro. de septiembre de 2012 y el 31 de agosto de 2014.

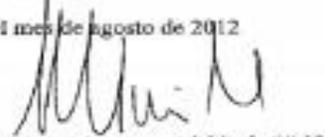
JORGE ARI NORIEGA ALVARADO	Experto en Metodología de la Investigación
NADIA YADIRA CASTAÑEDA GARCÍA	Investigadora
BORIS JULIÁN PINTO BUSTAMANTE	Experto en Bioética
LILIANA OVIEDO ALBÁN	Representante de la Comunidad
JAIRO ANDRÉS MARTÍNEZ JIMÉNEZ	Farmacólogo
MARÍA CRISTINA MEJÍA GAVILANES	Representante de la Comunidad
MÓNICA RIVA GUTIÉRREZ	Experta en Metodología de la Investigación
NOHORA STELLA JOYA RAMÍREZ	Experta en Bioética
ABELARDO LEAL HERNANDEZ	Abogado

ado en Bogotá, D.C., a los veintinueve (29) días del mes de agosto de 2012

NOTIFÍQUESE, COMUNÍQUESE Y CUMPLASE


JAIME ESCOBAR TRIANA
 Presidente (E) Consejo Directivo




JUAN GUILLERMO MARIN MORENO
 Secretario – Consejo Directivo