

Efecto de *Porphyromonas gingivalis* en la Activación y Adhesión de Plaquetas Humanas en Co-cultivo con Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana

María Alejandra Díaz Real

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

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Efecto de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en la Activación y Adhesión de Plaquetas Humanas en Co-cultivo con Células Endoteliales.
Grupo de Investigación:	Universidad El Bosque, Facultad de Odontología, Instituto UIBO(Unidad de Investigación Básica Oral)
Línea de investigación:	Biotecnología
Tipo de investigación:	Pregrado
Estudiantes:	María Alejandra Díaz Real
Director	Dra. Diana Marcela Buitrago Ramírez
Codirector y/o Asesor metodológico	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
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

Infinitas gracias a mis padres y hermana por su amor, esfuerzo y apoyo que me brindan día a día para alcanzar todas mis metas.

A Colciencias por permitir el desarrollo del proyecto y la financiación.

Gracias a la Dra. Diana Marcela Buitrago Ramírez y la Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil por su dedicación, apoyo, confianza y su acompañamiento durante estos años de desarrollo del proyecto. Ha sido de gran honor haber trabajado en el grupo UIBO (unidad de investigación Básica Oral), donde enriquecí y reforcé mis conocimientos en el ámbito investigativo y clínico.

A la Dra Diana Castillo, Yormaris, Nataly y Yineth grupo de Microbiología oral de la Universidad el Bosque, por su colaboración en la obtención de los inóculos bacterianos bacteria para la realización de los estudios de viabilidad y agregación plaquetaria con Bacteria completa de *P. gingivalis*.

A los investigadores: Sergio Viafara, Yersson Chacón, Sandra, Giovanni Delgado por su apoyo y colaboración en el desarrollo de los estudios de viabilidad celular.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
Introducción	
2. Marco teórico	3
2.1 Bacteria de <i>P.gingivalis</i>	4
2.2 Estructura de lipopolisacárido y su actividad endotóxica	4
2.3 Efecto del Lipopolisacárido sobre la Disfunción Endotelial	5
2.4 Fisiología plaquetaria	7
2.5 Rutas bioquímicas implicadas en la activación plaquetaria y adhesión plaquetaria	8
2.6 Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular asociada a la periodontitis	10
3. Planteamiento del problema	13
4. Justificación	14
5. Situación Actual	16
6. Objetivos	18
6.1 Objetivo general	18
6.2 Objetivos específicos	18
7. Metodología del Proyecto	19
7.1. Tipo de estudio	19
7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	19
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	20
7.3.1 Cultivo celular bacteriano	20
7.3.2 Extracción y purificación de Lipopolisacárido Bacteria periodontopatogena	21
7.3.3 Obtención de plaquetas humanas	21
7.3.4 Preparación de plaquetas humanas	22
7.3.5 Viabilidad de HCAEC y plaquetas humanas ante estímulos de bacteria completa y LPS de <i>P. gingivalis</i> W83	22
7.3.6 Modelo de estimulación bacteria completa viva	22
7.3.7 Estudio piloto para co-cultivo celular de plaquetas humanas y HCAEC	23
7.3.8 Evaluación de la expresión de COX-2	24
7.3.8.1 Extracción de RNA celular	24
7.3.8.2 Determinación de la expresión de gen Cox-2 RT-PCR	25
7.3.9 Determinación de P/E-selectina y PAC	25
7.3.10 Cuantificación de Tromboxano A	26

7.4. Hipótesis de estudio	27
7.5 Plan de tabulación y análisis.	27
8. Consideraciones éticas.	28
9. Resultados	29
9.1 Recuento Bacteriano	29
9.2 Caracterización del LPS de <i>P.gingivalis</i>	29
9.3 Efecto sobre la viabilidad celular de HCAEC estimuladas con LPS y Bacteria completa de <i>P.gingivalis</i> W83	30
9.4 Efecto sobre la viabilidad en plaquetas humanas estimuladas con LPS y Bacteria completa de <i>P.gingivalis</i> W83	32
9.5 Determinación del modelo de co-cultivo para los ensayos de adhesión y activación plaquetaria.	35
9.6 Activación de PAC y P/E-selectina en células HCAEC y Plaquetas humanas estimulados con LPS y bacteria completa de <i>P. gingivalis</i>	36
9.7 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>P. gingivalis</i> .	38
10. Discusión	39
11. Conclusiones	42
12 Financiación	43
13. Referencias bibliográficas	44
14. Anexos	50

RESUMEN

Efecto de *Porphyromonas gingivalis* en la Activación y Adhesión de Plaquetas Humanas en Co-cultivo con Células Endoteliales de arteria coronaria humana

Antecedentes: Estudios epidemiológicos han evaluado la asociación de periodontitis como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, ha sido respaldada por el aislamiento e identificación de periodontopatógenos en placas ateroscleróticas, siendo *Porphyromonas gingivalis* el más reportado, así como su lipopolisacárido (LPS). Estudios de experimentación *P. gingivalis* puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias activan mecanismos que estimulan la producción de factores proagregantes plaquetarios como el factor Von Willebrand y tromboxano A₂; la activación plaquetaria y subsecuente agregación, en la activación de células endoteliales que implica la expresión o liberación de varios factores como las moléculas de adhesión P-Selectina, VECAM-1, PECAM-1 conllevan la progresión de procesos ateroscleróticos. Sin embargo, la mayoría de estudios se han desarrollado en cultivos de células en monocapa o en modelos de co-cultivo en células de cordón umbilical (HUVEC).

Objetivo: Evaluar el efecto de la bacteria completa y el lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* W83 en la activación y adhesión de plaquetas humanas en co-cultivo con células de arteria coronaria humana (HCAEC).

Materiales y Métodos: Estudio experimental *in vitro*. Se desarrolló un modelo de co-cultivo con plaquetas humanas y células HCAEC, el cual se estimuló con LPS (1,0 3,5 y 7,0 µg/mL) bacteria completa de *P. gingivalis* (MOI: 100) a dosis repetidas. Se evaluó mediante citometría de flujo las moléculas de adhesión (P/E-selectina), activación (PAC) y mediante ELISA el tromboxano A₂.

Resultados: EL LPS de *P. gingivalis* induce un aumento de la expresión de PAC y P/E -selectina en plaquetas a la máxima concentración evaluada 7,0 µg/mL, mientras que la bacteria completa indujo un aumento solo de P/E-selectina en plaquetas en comparación frente a control. No se presentó cambios significativos en la expresión de estas moléculas en células HCAEC (p<0,05).

Conclusiones: *Porphyromonas gingivalis* induce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión y activación plaquetaria en un modelo de co-cultivo con HCAEC, demostrando *in vitro* el efecto de este periodontopatógeno sobre la activación y progresión de procesos ateroscleróticos.

Palabras claves: Co-cultivo, *Porphyromona gingivalis*, P/E-selectina, PAC, procesos ateroscleróticos.

ABSTRACT

Effect of *Porphyromonas gingivalis* on human platelet activation and adhesion in co-culture with human coronary artery endothelial cells

Background: epidemiological studies have evaluated the association of periodontitis as a risk factor for cardiovascular diseases, which has been supported by the isolation and identification of periodontopathogens in atherosclerotic plaques, being *Porphyromonas gingivalis* the most reported as well as its lipopolysaccharide (LPS). In experimental studies, *P. gingivalis* can induce the production of proinflammatory cytokines activating mechanisms that stimulate the production of platelet pro-aggregatory factors such as Von Willebrand factor and thromboxane A2. Platelet activation and subsequent aggregation, in the activation of endothelial cells that involves the expression or release of several factors such as adhesion molecules P-Selectin, VCAM-1, PECAM-1 involve the progression of atherosclerotic processes. However, most studies have been developed in monolayer cell cultures or in co-culture models in umbilical cord cells (UCC).

Objective: To evaluate the effect of the complete bacterium and the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* W83 on human platelets activation and adhesion in co-culture with human coronary artery endothelial cells (HCAEC).

Materials and Methods: *In vitro* experimental study. A co-culture model was developed with human platelets and HCAEC, stimulated with LPS (1,0 3,5 and 7,0 µg/mL). Complete bacterium of *P. gingivalis* (MOI: 100) at repeated doses. The adhesion molecules (P/E-selectin), activation (PAC) were evaluated by flow cytometry and thromboxane A2 was evaluated with ELISA.

Results: The LPS of *P. gingivalis* induces an increase in the expression of PAC and P/E -selectin in platelets at the maximum concentration evaluated 7.0 µg/mL, while the complete bacterium induced an increase only of P/E-selectin in platelets compared to control. There were no significant changes in the expression of these molecules in HCAEC cells (p <0.05).

Conclusions: *Porphyromona gingivalis* induces an increase in the expression of adhesion molecules and platelet activation in a co-culture model with HCAEC, demonstrating in-vitro the effect of this periodontopathogens on the activation and progression of atherosclerotic processes.

Keywords: Co-culture, *Porphyromona gingivalis*, P/E-selectin, PAC, atherosclerotic processes.

1. Introducción

Los estudios epidemiológicos que han evaluado la asociación de riesgo de periodontitis para enfermedades cardiovasculares han sido objeto de revisiones sistemáticas y se ha encontrado que al analizar la evidencia en conjunto, se mantiene una asociación entre la periodontitis y enfermedades cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio, e incluso la asociación con periodontitis tiene mayor fuerza con accidente cerebro-vascular (Janket et al., 2003). La infección periodontal de naturaleza crónica parece perpetuar una respuesta sistémica mediada por antígenos de bacterias que activan anticuerpos, células endoteliales y monocitos generando un aumento en los niveles circulantes de citosinas, proteínas de fase aguda, factores pro-inflamatorios y pro-coagulantes que aumentan el riesgo cardiovascular (Noack et al., 2001; Slade et al., 2003). Altos niveles de anticuerpos para *P. gingivalis* han sido altamente asociados con arterioesclerosis (Noack et al., 2001; Janket et al., 2003).

El lipopolisacárido (LPS) promueven la activación e inflamación de manera similar; de los mecanismos de transcripción y postransduccional interrelacionados con los mecanismos intracelulares, en los que se incluye: 1) Activación de la fosfolipasa C y proteína quinasa C, que conduce a estimulación de formación de oxígeno reactivom. 2) La activación de factores de transcripción tales como factores nucleares NF- κ B, y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF). 3) Activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) mediante la formación de prostaglandinas E2 (PGE2). 4) Aumento de la producción de óxido nítrico (NO) inducible (Lund et al., 2007; Wostern et al., 2010).

La mayoría de estudios demuestran que el efecto proagregante plaquetarios producido por los lipopolisacáridos de periodontopatógenos está relacionado con el reconocimiento de receptores TLR4. Aunque es evidente que muchas bacterias pueden adherirse a las plaquetas e inducir la agregación plaquetaria, es importante confirmar que esto no es simplemente un artefacto in vitro. Por lo cual es importante evidenciar la generación de la señal en las plaquetas en respuesta a su interacción con las bacterias.

Se ha demostrado que *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), un patógeno periodontal importante y frecuentemente aislado de bolsas infectadas de pacientes con periodontitis,

induce la expresión de moléculas de adhesión celular, incluyendo ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), VCAM -1 (molécula de adhesión de células vasculares), P-selectina, que se consideran pasos clave en el inicio de la disfunción endotelial. Debido a que los modelos *in-vitro* tradicionalmente han sido desarrollados a exposición única de endotoxinas o bacteria completa. Cuestionando su aplicación en investigación, lo cual no refleja un aspecto importante de la asociación entre infección y enfermedad cardiovascular como lo es la reiterada exposición del endotelio a los procesos de bacteremias y endotoxemias, los cuales se han reportado en pacientes con periodontitis, especialmente ante raspaje y alisado radicular, función masticatoria, cepillado y/o uso de seda dental (Khlgtian et al., 2002) y que podrían representar cambios en la respuesta endotelial en comparación a los modelos de exposición a dosis única. Por lo cual es de gran interés comparar la capacidad de respuesta del endotelio HCAEC co-cultivado con plaquetas humanas para la evaluación de moléculas de adhesión y activación involucradas en procesos pro-inflamatorios a dosis repetidas del lipopolisacárido (LPS) de *P. gingivalis*.

2. Marco teórico

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades inflamatorias crónicas más comunes en los seres humanos. Afecta a los tejidos que tienen los dientes firmemente en la mandíbula se inicia en forma de gingivitis, en ausencia de tratamiento, progresa de forma continua a periodontitis y finalmente, pérdida de los dientes. Los agentes etiológicos están presentes en el biofilm bacteriano, que se deposita continuamente en la raíz y en la superficie del diente (Champaiboon et al., 2014). Su etiología es multifactorial y su prevalencia se estima entre el 30 y el 40 % de la población adulta. En las bolsas periodontales existen más de 15 linajes bacterianos donde en cada uno de ellos contiene más de 100 géneros y 600 especies. En las bolsas periodontales existen más de 15 linajes bacterianos donde en cada uno de ellos contiene más de 100 géneros y 600 especies. (López et al., 2003).

Socransky *et, al* (1992) indujeron complejos bacterianos donde el complejo rojo se encuentran los anaerobios más frecuentes asociados a la periodontitis entre esos *P. gintgivalis* se aísla del surco gingival especialmente cuando no existe una buena salud periodontal, y se ha asociado especialmente con la progresión de la periodontitis crónica en el adulto (figura 1).

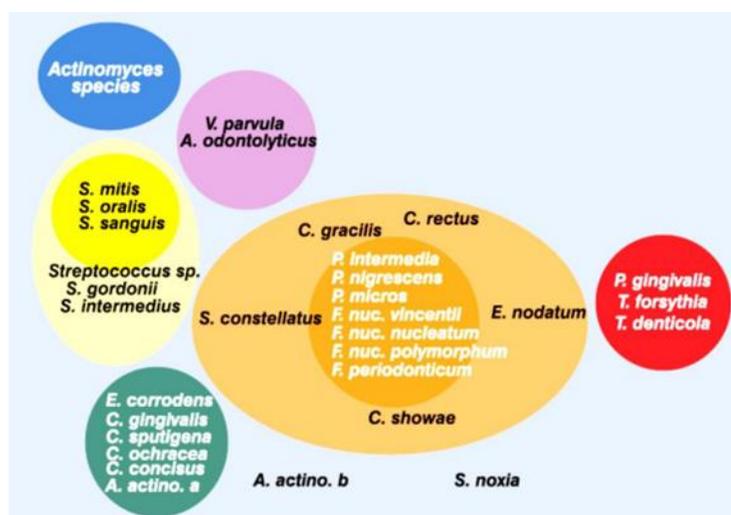


Figura 1. Complejos Bacterianos (Socransky y cols 2008).

Se caracterizan por ser bacilos pleomórficos o cocobacilos, inmóviles, no esporulados. Carecen de metabolismo fermentativo. La cisteína proteinasas producidas por este patógeno, denominadas gingipainas, se consideran importantes factores de virulencia. Entre otras muchas actividades potencialmente nocivas, las gingipainas específicas de arginina-R (RgpB y HRgpA) activan eficazmente los factores de coagulación (Socransky y Haffajee,1992).

2.1. *Porphyromona gingivalis*

Es un cocobacilo gram negativo, anaerobio no esporulado que mide 0.5 - 0.8 μm x 1 - 3.5 μm (figura 2), habita en el área subgingival y está implicado en la etiología y patología de la enfermedad periodontal. Los factores facultativos de virulencia que posee son capsula y fimbrias; las fimbrias son apéndices filamentosos cuyo principal componente es una proteína que media la adherencia a componentes de la matriz extracelular a otras cepas bacterianas y a células de la inmunidad innata (Orrego et al., 2015).



Figura 2. Colonias de *P. gingivalis* (Gualtero et al., 2014)

2.2. Estructura de lipopolisacárido y su actividad endotóxica

El Lipopolisacárido son polímeros complejos con restos de ácidos forman la mayoría de la capa externa de la membrana de bacterias Gram-negativas. Inducen una respuesta inmune local y sistémica en el hospedero (Silipo et al., 2009) (figura 3). Están en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana. Se compone de una porción lípido A, en la cara externa de la membrana externa de la bacteria, y una porción hidrofílica compuesta por azúcares que presenta una gran variabilidad estructural (Rojas,1998).

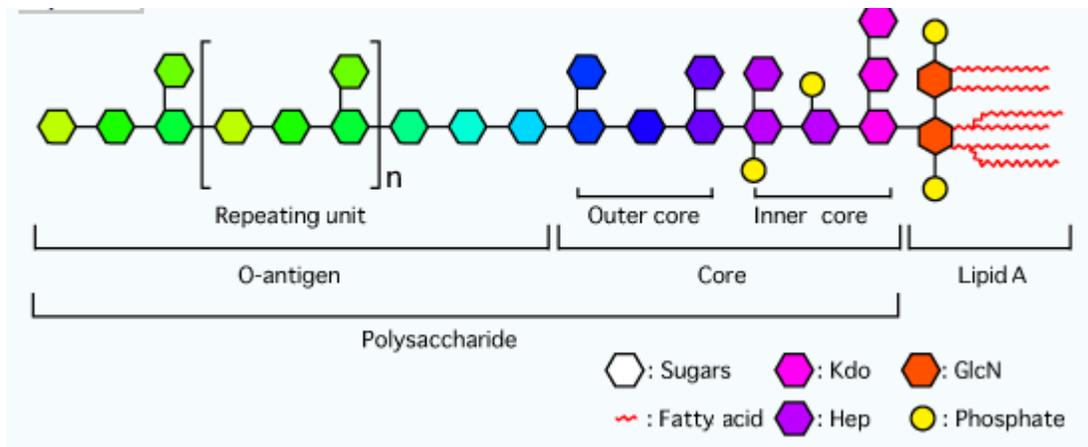


Figura 3. Estructura del lipopolisacárido (Gemma et al., 2016)

- El lípido A es responsable de las propiedades fisiopatológicas de las endotoxinas.
- El polisacárido O, porción más externa, de la bacteria su especificidad serológica.
- El oligosacárido nuclear o core une el polisacárido O al lípido A.

El lipopolisacárido es un glicoconjugado lipídico que mantiene la integridad estructural de las bacterias Gramnegativo 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 (Jain y Darveau, 2010). Está compuesto de 3 dominios: lípido A, core de oligosacárido y el antígeno O también conocido como polisacárido O. El lípido A es el componente interno del LPS que le confiere anclaje a la membrana además de las propiedades endotóxicas caracterizado por ser el componente más conservado en estructura y forma. El O-polisacárido por su parte es la porción más externa del LPS y su estructura es altamente variable y también inmunogénica, lo que permite la tipificación tal como se describió anteriormente (Jain y Darveau, 2010).

2.3 Efecto del Lipopolisacárido sobre la Disfunción Endotelial

Parámetros clínicos como el sangrado gingival hacen parte de la inmunopatogénia de asociación entre periodontitis y aterosclerosis ya que bacteriemias transitorias han sido ampliamente reportadas en paciente con periodontitis (Glurich et al., 2002), lo cual se traduce en mayores niveles de marcadores biológicos de inflamación como son el TNF α , IL-1, IL-6 y PCR (proteína c reactiva) ultrasensible; comparados con pacientes que no sufren periodontitis (Loos et al., 2000; Noack et al., 2001).

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 (Kinane et al., 2005; Iwai, 2009) e incluso con las actividades diarias como es la masticación y el cepillado (Noack et al., 2001). 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 et al., 2007). Aunque el tratamiento periodontal puede disminuir los niveles de biomarcadores de inflamación sistémicos y de disfunción endotelial en estudios de corto tiempo, no hay evidencia de que prevenga eventos de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (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 et al., 2005).

El modelo que explica la posibilidad de desarrollar aterosclerosis mediado por endotoxinas basado en estudios *in vitro* con *E. coli* (Hirschfeld et al., 2001) 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 (Rurenga et al., 2013). Como respuesta al estímulo, las células endoteliales producen moléculas pro-inflamatorias como IL-6, TNF alfa, superóxido (O_2^-), IL-8 y proteína quimioattractante de monocito (MCP-1) (Nakamura et al., 2008). 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 (molécula de adhesión de células vasculares 1), ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) (Nakamura et al., 2008) 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 (Stoll et al., 2004).

2.4 Fisiología plaquetaria

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 (figura 4).

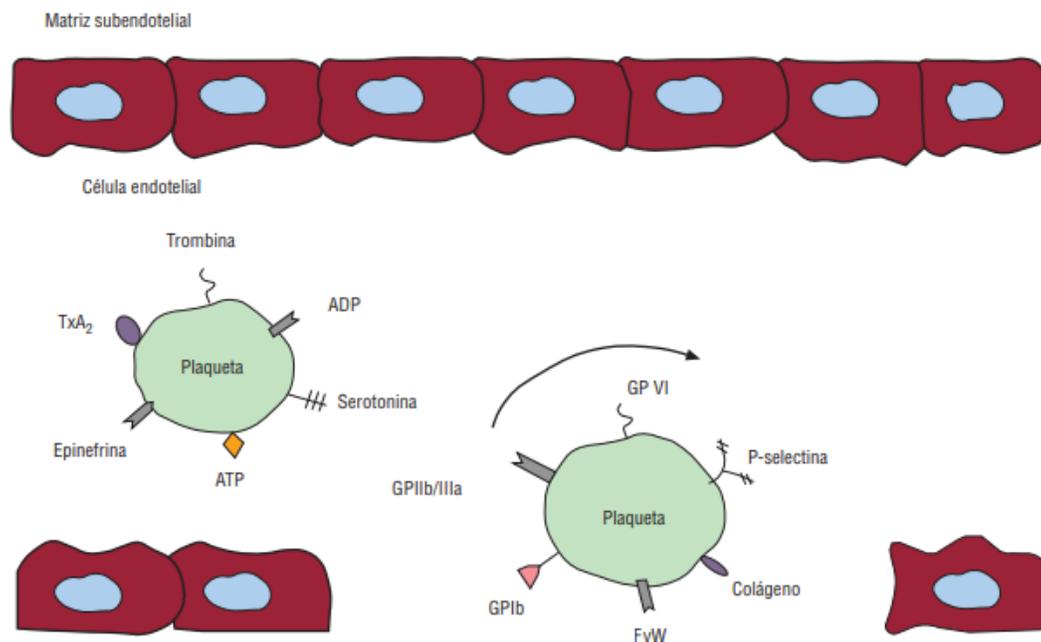


Figura 4. Agonistas y proteínas principales de adhesión plaquetaria. (López Farré et al., 2013).

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.

Las plaquetas se adhieren a superficies artificiales y utilizan como ligando al fibrinógeno por la unión a GPIB/IIIa, y se adhieren al colágeno (tipo I y III) (figura4), vWF, fibronectina, laminina. En condiciones de bajo flujo sanguíneo, este evento es mediado por la interacción vWF-GPIb, pero en condiciones de alto flujo también se requiere la participación de GPIIb/IIIa. Forman enlaces que dependen de la estructura fibrilar del colágeno y de la cantidad de subunidades RGD. La adhesión plaquetaria al colágeno requiere de la interacción del colágeno con vWF del plasma, GPIb, GPIIb/IIIa de la membrana plaquetaria que durante la formación del coágulo establecen enlaces plaqueta-fibrina. Produce la internalización de las mallas de fibrina o de colágeno, son rodeados por microfilamentos (García y Coma 2000).

La trombina es una enzima y facilita la producción de fibrina desde el fibrinógeno. Los receptores activados por la proteasa (PAR) son receptores de trombina. Al unirse la trombina al receptor PAR-1 produce la activación de la plaqueta con concentraciones bajas de trombina (EC50, 50 pM), ocurre una liberación proteolítica en la molécula del receptor, que produce la activación de cuatro tipos diferentes de proteínas G que estimulan señales diferentes en la célula, PAR-1 y el PAR-4 se expresan en las plaquetas humanas y estimulan la agregación y secreción plaquetarias (Badimón y González, 2006).

2.5 Rutas bioquímicas implicadas en la activación y adhesión plaquetaria

Las funciones realizadas por las plaquetas en el organismo necesitan ser reguladas por un organismo, que permite un acople adecuado de las respuestas extracelulares y las respuestas intracelulares. En cada etapa de la agregación plaquetaria actúan ciertos mecanismos específicos para cada una de ellas (Rivera et al., 2014).

La glicoproteína b alfa (GPIb α) actúa en la primera fase, frenando las plaquetas sobre en 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 (Rivera et al., 2014).

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 induzca 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 plaqueta 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 (Rivera et al., 2014).

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 (α IIb β 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 (Rivera et al., 2014). Las moléculas de adhesión actúan como ligandos de las integrinas presentes en las membranas de los leucocitos, cuando el endotelio se activa produce una expresión de citocinas como la interleucina 1 (IL-1), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el fibroblasto básico (bFGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos [MCP-1]), y la exposición proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión para receptores específicos de leucocitos circulantes. Las moléculas de adhesión entre estas las selectinas, como la E y la P y las de las inmunoglobulinas, como las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y las moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM1, 2 y 3) (Badimón y González, 2006).

2.6 Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular asociada a la periodontitis

En la bolsa periodontal se encuentra a gran cantidad de bacterias gramnegativas 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 (Alonso et al., 2008).

El carácter inflamatorio de la aterosclerosis ha centrado diferentes investigaciones al estudio de las infecciones crónicas como potencial causa de las lesiones ateroscleróticas siendo 1988 el año en el que las primeras evidencias serológicas de la época mostraban asociación entre infección bacteriana y enfermedad coronaria crónica e infarto agudo de miocardio (Saikku et al., 1988).

Teniendo en cuenta que la periodontitis es probablemente de las infecciones crónicas de origen bacteriano más extendidas en el ser humano es relevante conocer su asociación con el riesgo de sufrir síndrome de arteria coronaria (Mattila et al., 1993; Gotsman et al., 2007).

Se cree que hay dos procesos principales por los que la enfermedad periodontal y la aterosclerosis puedan estar relacionadas. Uno es por el efecto local de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) sobre el endotelio vascular, los cuales aumentan en última instancia los niveles de fibrinógeno y mediadores inflamatorios; afectando negativamente la evolución de la aterosclerosis (Gemmell et al., 1997; Geismar et al., 2006); y el otro, debido a que ambas patologías comparten factores de riesgo que pueden actuar de manera sinérgica sobre la evolución de la aterosclerosis. El primer proceso recibe el nombre de "*vía directa*" y el segundo de "*vía indirecta*".

Vía indirecta: Tanto la periodontitis como la aterosclerosis son enfermedades inflamatorias crónicas multifactoriales y, además, comparten factores de riesgo como la edad, género, el tabaquismo, la diabetes mellitus (mal controlada) entre otros, por lo que podrían coexistir como un complejo o síndrome (Offenbacher et al., 1999; Mattila et al., 1993).

Vía directa: En los últimos años ha ido creciendo el interés por la posible relación existente entre factores microbiológicos y la etiopatogenia de la aterosclerosis. Diversos estudios muestran como la infección por periodontopatógenos toma rol en la activación endotelial (Mattila et al., 1993; Gotsman et al., 2007).

El estudio del mecanismo molecular y celular para explicar la asociación entre periodontitis y enfermedades sistémicas se ha basado principalmente en la célula endotelial y el reconocimiento directo de factores de virulencia bacterianos como LPS, exotoxinas, etc y citoquinas proinflamatorias que potencian procesos inflamatorios vasculares favoreciendo procesos de disfunción endotelial (Katz et al., 2001).

La vía directa como argumento para explicar la relación causal entre enfermedad periodontal y aterosclerosis no solamente ha sido soportado por el efecto de la carga bacteriana y sus factores de virulencia sobre la biología vascular, el papel de las citocinas pro-inflamatorias también inciden en la progresión de la aterosclerosis (Kinane et al., 2005).

La mayor parte de la destrucción ósea observada en la periodontitis es causada por mediadores inflamatorios del huésped (IL-1, TNF- α) en respuesta al ataque bacteriano y sus metabolitos (Listgarten, 1987;Kebuschull et al., 2010). 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.

3. Planteamiento del problema

La periodontitis incide en el sector de la salud pública como una de las infecciones crónicas de mayor prevalencia sobre la población adulta, que además de afectar de manera irreversible los tejidos de soporte dental, también ha sido asociada con los procesos ateroscleróticos, una de las enfermedades cardiovasculares con mayor tasa de morbimortalidad a nivel mundial (Lafaurie et al., 2007). Debido a que ambas entidades comparten la vía crítica de la inflamación, el papel de los periodontopatógenos y sus factores de virulencia como el lipopolisacárido (LPS) toman un rol trascendental. Una vez alcanzan circulación periférica podrían favorecer el inicio o desarrollo de respuestas inflamatorias vasculares que podría traducirse en activación de células endoteliales, leucocitos e incluso plaquetas aumentando los niveles plasmáticos de citosinas, proteínas de fase aguda y factores pro-coagulantes entre otros (López et al., 2003; Mustaphaet al., 2007).

Según reportes previos de la literatura, la asociación entre enfermedad periodontal y riesgo cardiovascular, ha sido inicialmente respaldada por el aislamiento e identificación de periodontopatógenos en placas ateroscleróticas, siendo *P. gingivalis* el más reportado, así como su LPS. Según estudios de experimentación *P. gingivalis* puede inducir disfunción endotelial, respuesta pro-inflamatoria ateroscleróticas y agregación plaquetaria (Noack et al., 2001; Kechschull et al., 2010 ;Champaiboon et al., 2014). Sin embargo, de los pocos estudios *in vitro* la mayoría han sido realizados sobre células endoteliales venosas de cordón umbilical (HUVEC).

Aspecto muy relevante, ya que en la fisiopatología de la aterosclerosis y/o aterotrombosis, las células endoteliales arteriales que irrigan el corazón son las principalmente asociadas con infarto agudo al miocardio, lo cual refleja que estudiar la aterosclerosis sobre células endoteliales venosas es una limitante al de los modelos *in-vitro*, además que el efecto de *P. gingivalis* sobre la activación y agregación plaquetaria no está completamente definido y mucho menos en modelos de co-cultivos. Por lo cual es de gran interés evaluar el efecto del LPS y bacteria completa de *P. gingivalis* W83 sobre la activación y adhesión de plaquetas humanas en co-cultivo con células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC).

4. Justificación

La infección periodontal es la infección crónica de mayor prevalencia en el adulto y por su naturaleza crónica 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 citocinas, proteínas de fase aguda, factores pro-inflamatorios y pro-coagulantes que aumentan el riesgo cardiovascular (López et al., 2003; Lafaurie et al., 2007).

La inducción de endotoxemias por patógenos periodontales induce una mayor actividad de la respuesta inflamatoria en las lesiones vasculares. Los LPS de bacterias gram negativas inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias por monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares que activan mecanismos pro-inflamatorios y podrían actuar como mediadores que estimulan la producción de fibrinógeno (factor relacionado con hipercoagulabilidad y protrombótico (López et al., 2003). A su vez la activación plaquetaria y agregación se puede deber al Tromboxano A₂ (mediador que aparece en la periodontitis) y al Factor Von Willebrand que puede aparecer en los procesos infecciosos liberado por las células endoteliales debido al daño que sufren por acción de los lipopolisacáridos bacterianos (también lo liberan plaquetas activadas) (López et al., 2003). Todos estos cambios en la hemostasia primaria pueden estar asociados con las infecciones crónicas como la periodontitis y el desarrollo de las placas de ateroma pero que aún no se han estudiado en detalle.

Los motivos que nos llevaron a investigar el efecto de *Porphyromonas gingivalis* W83 en la activación y adhesión 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 los periodontopatógenos y aunque se cuenta con dos décadas de evidencia que asocian la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares aterotrombóticas, aún no existe conocimiento claro sobre este aspecto. De esta manera, los datos obtenidos en este estudio tomarán gran trascendencia en el tiempo ya que permitirá establecer las bases de una respuesta agregante *in-vitro*, que no ha sido caracterizada para

posteriormente centrar bases para la generación de nuevas alternativas terapéuticas, considerando un impacto positivo a largo plazo ya que tanto la periodontitis como las enfermedades aterotombóticas ocupan un importante primer plano como enfermedades crónicas prevalentes de mayor morbilidad y mortalidad según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

5. Situación actual

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado la asociación de la periodontitis (periodontopatogenos en los tejidos del huésped) con enfermedades cardiovasculares y enfermedades arterioscleróticas, El papel del periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* como posible contribuyente a la aterosclerosis ha sido investigado en sistemas modelo usando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Champaiboon et al., 2014). Estructura del lipopolisacárido de bacterias Gram negativas y su actividad endotóxica: Las bacterias Gram negativas presentan una membrana externa conformada por Lipopolisacaridos (LPS), el cual es uno los principales factores de virulencia que inducen una respuesta inmune local y sistémica en el hospedero.

Estas moléculas se caracterizan por ser resistentes a altas temperaturas y son consideradas endotoxinas por su capacidad pirogénica en el hospedero. Los LPS son glicoconjugados conformados por tres regiones: el antígeno O, el core o núcleo y el lípido A. El antígeno O es una región polisacárida utilizada para la serotipificación de las cepas. El lípido A es la región lipídica del LPS, está conformado por dos glucosaminas con acilaciones por varios ácidos grasos y es la estructura responsable de la actividad endotóxica de los LPS (Rietschel et al., 1994).

Roll del Lipopolisacárido y la agregación plaquetaria: La mayoría de estudios en los que se ha demostrado el efecto de los LPS sobre los procesos pro-inflamatorios usan como referencia el LPS de *E. coli* el cual difiere estructural y funcionalmente del LPS de los periodontopatógenos. Los resultados in vitro que hemos obtenido utilizando los LPS de microorganismos periodontopatopáticos como *Porphyromonas gingivalis* W83 y *E. corrodens* ATCC 23834, sugieren es que estos inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VECAM-1 y PECAM-1) en células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) mediante el reconocimiento de los receptores TLR2 y TLR4 lo que demuestra que estos factores de virulencia de los microorganismos asociados a la periodontitis pueden ser responsables de la iniciación y progresión de la disfunción endotelial que conlleva a un riesgo de enfermedad cardiovascular (datos en proceso de publicación). El lipolisacárido de *P. gingivalis* puede inducir la liberación de interleucina 1L y tromboxanoA2 (TxA2) favoreciendo el infiltrado de células inflamatorias, la adhesión y

agregación plaquetaria lo cual promueve la formación de células espumosas en la íntima vascular (López et al., 2003). “La periodontitis puede provocar alteraciones hemostáticas, como el aumento del fibrinógeno plasmático, del recuento de glóbulos blancos, de la proteína C reactiva y de la viscosidad de la sangre. Además, se ha encontrado una relación del factor von Willebrand, o factor VIII (glicoproteína sintetizada por las células del endotelio vascular y megacariocitos), con el LPS y la IL-1, quienes inducen la liberación de este factor desde las células endoteliales, generando la agregación de plaquetas y focos inflamatorios donde se puede generar un trombo” (López et al., 2003). La asociación de enfermedad periodontal y cardiovascular en relación a la fisiopatología involucrada en la agregación plaquetaria es de gran interés con el fin de poder demostrar que la periodontitis es un factor de riesgo de enfermedades sistémicas cardiovasculares.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de bacteria completa y lipopolisacárido de *Phorphyromonas gingivalis* W83 en la activación y adhesión de plaquetas humanas en co-cultivo con células de arteria coronaria humana (HCAEC).

6.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la expresión de marcadores de adhesión plaquetaria (P- selectina) en un modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con bacteria completa y LPS de *Phorphyromonas gingivalis* W83.
- Identificar los niveles de Tromboxano A2 en un modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con bacteria completa y LPS de *Phorphyromonas gingivalis* W83.
- Determinar la expresión de marcadores de activación plaquetaria(PAC) en un modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con bacteria completa y LPS de *Phorphyromonas gingivalis* W83

7. Metodología del proyecto

7.1 Tipo de estudio

Experimental *In vitro*

7.2 Población y muestra

7.2.1 Población de estudio: Plaquetas de donantes voluntarios sanos y células HCAEC

7.2.2 Muestra del estudio: Línea comercial de células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC,) LONZA, Walkersville USA .Plaquetas humanas obtenidas de la fundación hematológica Colombia de donantes voluntarios sanos mayores de edad con previo consentimiento informado.

7.3 Métodos y técnicas

7.3.1 Cultivo celular bacteriano

Las cepas W83 de *P. gingivalis* fue obtenida a partir de cultivo primario. Esta cepa fue cultivada en Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque en agar Brucella (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) enriquecido con 0,3% p/v de Bacto agar, 0,2% p/v de extracto de levadura, 5% v/v de sangre de cordero desfibrinada, 0,2% v/v de sangre hemolizada, 0,0005% p/v de hemina y 0,00005% p/v de menadiona. Cada bacteria se incubo a 36°C en una atmósfera de anaerobiosis con 9-13% de CO₂ a concentraciones por debajo del 1% de oxígeno (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England), *P. gingivalis* por 4 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las características macroscópicas de las colonias formadas y se realizaron pruebas bioquímicas que confirmaron la pureza del cultivo (Gualtero et al., 2014). Al finalizar el periodo de incubación, se verifico la pureza del cultivo a través de análisis morfológicos y pruebas bioquímicas (Rurenga et al., 2013).

7.3.2 Extracción y Purificación de lipopolisacarido de *Porphyromonas gingivalis*

El procedimiento de extracción y purificación de LPS de *P. gingivalis* se realizó según lo reportado por Gualtero y cols., (2014). La extracción del lipopolisacárido se realizó con fenol acuoso a partir de 1,1 g de bacteria completa húmeda de *Porphyromonas gingivalis* W83, 3, en 5.5 mL de agua USP se realizó la extracción con 18 mL de fenol al 90 % v/v y 18 mL de agua USP, incubando 10 min a 68 °C en agitación a 175 rpm (SHAKER BATH marca LaB - Line) e inmediatamente llevando a baño de hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 5000 *g* por 20 min a 6 °C, recuperando la fase acuosa. La fase fenólica fue de nuevo sometida a re-extracción dos veces más. Para eliminar las trazas de fenol en la fase acuosa se llevó a cabo una diálisis con membrana de tamaño de poro 10 kDa (SnakeSkin™.Thermo Scientific, USA) en 1 L de agua estéril grado I (Direct-Q3., Millipore) a 4 °C y con cambio de agua cada 8 horas por 3 días. El extracto obtenido fue centrifugado a 10000 *g* por 20 min, y al sobrenadante separado se le adicionó acetato de sodio a una concentración final 0.15 M. Para inducir precipitación se colocó la solución en baño de hielo, se adiciono etanol 96 % v/v gota a gota en agitación constante a una proporción 1:4 (muestra: etanol) con respecto a la cantidad de extracto resultante. La solución fue almacenada durante 24 h a - 20 °C para continuar con el proceso de precipitación.

Posteriormente se centrifugo a 4000 *g* por 5 min a 4 °C, eliminando el sobrenadante y se determinó la masa del precipitado obtenido. Se reconstituyo el precipitado en agua USP a una concentración final de 25 mg/mL y se liofilizo durante 24 h (Heto power dry LL3000, Bomba Thermo Savant).

7.3.3 Obtención de plaquetas humanas

Se utilizó Plasma rico en plaquetas (PRP) de donantes voluntarios sanos previo consentimiento informado, que se adquirió de la Fundación Hematológica Colombia mediante el convenio interinstitucional que hay entre la Universidad El Bosque y la fundación.

7.3.4 Preparación plaquetas Humanas

Para la preparación del tampón de lavado plaquetario (pH 6,0), se utilizó los siguientes reactivos: cloruro sódico 140 mM, cloruro potásico 5 mM, citrato trisódico 12 mM, glucosa 10 mM y sacarosa 12,5 mM (Merck). Para la preparación del tampón de resuspensión plaquetario (pH 7,4), se utilizaron los siguientes reactivos: HEPES (*N*-[2-Hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) 10 mM, cloruro sódico 140 mM, cloruro potásico 3 mM, cloruro magnésico 0,5 mM, bicarbonato sódico 5 mM, glucosa 10 mM y CaCl₂ mM (Merck).

Para la obtención de plaquetas lavadas se realizó el siguiente procedimiento: Las unidades de plaquetas se sometieron a una primera centrifugación a baja velocidad (1200 rpm, 8 minutos) después de ser diluidas previamente 1:1 en un tampón de lavado plaquetario (pH: 6,0). La suspensión plaquetaria, desprovista ya de glóbulos rojos, se volvió a depositar sobre un nuevo tampón de lavado y se realizó una nueva centrifugación a 1200 rpm, durante 18 minutos, posteriormente el precipitado de plaquetas se suspendió en el tampón de re suspensión plaquetario (pH: 7,4). La suspensión de plaquetas lavadas se ajustó a una concentración de 2x10⁸ células/μL (Stach et al., 2012), simulando así las condiciones fisiológicas de las plaquetas.

A continuación, se adiciono CaCl₂ a la suspensión plaquetaria para obtener una concentración final de 2 mM de CaCl₂ y se mantuvo en reposo durante 45 minutos, tiempo

suficiente para que las plaquetas capten calcio del medio y puedan responder de forma fisiológica.

7.3.5 Viabilidad de HCAECs y plaquetas humanas ante estímulos de bacteria completa y LPS de P. gingivalis W83

Se utilizó 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 15.000 células/pozo en placas de 96(CytoOne, Japan) por 20 horas en condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37°C), para lograr el establecimiento previo de la monocapa hasta alcanzar una confluencia mayor a 80% antes de la estimulación. Las células HCAECs fueron estimuladas por 24 horas con MOI: 0.1, 1, 10, 50, 100 y LPS (200- 3,5 ug/mL) *P. gingivalis W83* y posteriormente se evaluó su efecto en la viabilidad celular HCAECs mediante el kit comercial LIVE/DEAD viability/cytotoxicity (ThermoFisher Scientific, USA). La fluorescencia de las células consideradas vivas fue medida en unidades relativas de fluorescencia con filtros de excitación de 485 nm y emisión de 530nm. Se utilizó como control de viabilidad; células y plaquetas sin estimular y como control positivo Tween-20 al 1% en solución de TBS. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y de manera independiente.

7.3.6 Modelo de estimulación de células HCAEC con Lipopolisacárido y Bacteria completa de P. gingivalis.

Se usó la línea celular HCAEC (LONZA, Walkersville USA), las cuales se sembraron en medio EGM2 MV (LONZA,Walkersville. USA) entre pases 7-9 a una densidad de 200.000 células/pozo en placas de 12 pozos (CytoOne, Japan) por 20 horas en condiciones controladas de humedad y temperatura (5% de CO₂ y 37°C), para lograr el establecimiento previo de la monocapa hasta alcanzar una confluencia mayor a 80% antes de la estimulación. Las células HCAECs fueron estimuladas en tres diferentes tiempos dentro del rango de 24 horas distribuidas de la siguiente manera: dosis 1: por 6 h, dosis 2: por 6h y dosis 3 por 12h para el mismo pozo o condición al MOI seleccionado según ensayo viabilidad (MOI:100) y de LPS (1, 3,5 y 7 µg/mL), a su vez se realizó un estímulo a dosis única de LPS (1µg/mL) y bacteria completa MOI:100 con el fin de comparar los estudios de

dosis única como se reporta por literatura y dosis repetida el interés de nuestro estudio. Una vez transcurrieron las 24 horas de exposición a los tratamientos evaluados, se procedió al montaje del co-cultivo, según diseño descrito a continuación.

7.3.7 Estudio piloto del modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con LPS y Bacteria completa de P. gingivalis

Una vez transcurrieron las 24 horas de exposición con LPS y bacteria completa de *P. gingivalis*, se procedió al montaje del co-cultivo con plaquetas humana para lo cual se propuso dos modelos de co-cultivo (tabla 1) 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 y bacteria completa a dosis repetidas por 24 horas y no estimulación de las plaquetas antes de ser co-cultivadas con las células.

Modelo 2: Células endoteliales estimuladas con LPS y bacteria completa a dosis repetidas por 24 horas y estimulación previa de las plaquetas con *P. gingivalis* y posterior co-cultivo con las células.

Las plaquetas fueron estimuladas con los tratamientos de acuerdo a la tabla 1 (Modelo 2); o sin ningún tratamiento (Modelo 1). Posteriormente se sembraron sobre la monocapa endotelial a una concentración final de 2×10^8 /mL y homogéneamente distribuidas favoreciendo el contacto directo con la monocapa de HCAEC por 1 hora en constante agitación. Adicionalmente verificamos la interacción y homogeneidad en la distribución del co-cultivo mediante observación directa al microscopio. Con el fin de confirmar cuál de los dos modelos podría ser usando en las siguientes etapas del estudio se realizó mediante RT-PCR la identificación de COX-2 en células HCAEC estimuladas con LPS a las concentraciones de 7 y 3,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, debido a que esta molécula se produce de manera inductiva en proceso de infección.

Tabla 1. Diseño de los modelos de co-cultivo 1 y 2 del estudio piloto.

Modelo 1 de estimulación	Descripción de la condición
HCAEC	Basal de cultivo
HCAEC+ Plaquetas	Basal de co-cultivo
HCAEC+LPS 1 µg/mL	Cultivo
HCAEC+LPS 3.5 µg/mL	Cultivo
HCAEC+LPS 7 µg/mL	Cultivo
HCAEC+ BC (MOI:100)	Cultivo
Modelo 2 de estimulación	Descripción de la condición
HCAEC	Basal de cultivo
HCAEC +plaquetas	Basal co-cultivo
HCAEC-LPS+plaquetas-LPS 1 Ug/ml	Co-cultivo
HCAEC-LPS+plaquetas-LPS 3.5 Ug/ml	Co-cultivo
HCAEC-LPS+plaquetas-LPS 7 Ug/ml	Co-cultivo
1. HCAEC-BC+plaquetas-BC MOI 100	2. Co-cultivo

7.3.8 Evaluación de la expresión de COX-2 en los modelos de co-cultivo de células HCAEC y Plaquetas humanas.

7.3.8.1 Extracción de RNA celular

El RNA total de las células HCAEC, fue extraído empleando el kit Quick-RNATM MicroPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA). El RNA obtenido se resuspendió en 20 uL de agua libre de nucleasas, se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se almacenó a -80°C hasta uso.

7.3.8.2 Determinación de la expresión de gen Cox-2 por RT-PCR

La reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), fue realizada en un solo paso usando los reactivos del RT-qPCR Luna Universal One-Step kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 10 µl ajustados con 5 µl de Luna Universal One-Step Reaction Mix [2x], 0,5 µl de Luna WarmStart RT Enzyme Mix [20X], 0,2 µl de cada primer [10 µM] y 4,1 µl de templete [10 ng/µl]. La amplificación de los fragmentos se ejecutó en un equipo Bio- Rad CFX-96 programando como sigue: 55 °C por 10 min, 1 ciclo a 95 °C por 1 min, seguido por 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 s y 60 °C por 30s. La secuencia de cebadores empleados para este análisis se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de cebadores empleados en ensayos de expresión génica

Gen	Primer F	Primer R
COX-2	GATGATGTATGCCACAATCT (Tsioufis et al., 2011)	AGTCTCTCCTATCAGTATTAGC (Hayashi et al., 2010)

7.3.9 Determinación de P/E- selectina y PAC en células HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con LPS y Bacteria completa de *P. gingivalis*.

Después de identificar mediante RT-PCR la expresión de Cox-2 en los modelos piloto de co-cultivo; se determinó continuar usando el modelo 2 en donde se estimula las plaquetas con LPS y bacteria completa previo al co-cultivo con HCAEC. Después de la estimulación e incubación durante 1 hora del co-cultivo se obtuvo el sobrenadante para el análisis mediante ELISA de los niveles de tromboxano A₂, se removieron las plaquetas y lavaron con PBS y se tripsinizaron las células HCAEC para su respectivo procedimiento de evaluación de moléculas de adhesión (P/E-selectina) y activación (PAC) mediante citometría de flujo.

Para el análisis mediante citometría de flujo; las plaquetas y células HCAEC se resuspendieron en 100 uL de PBS se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti CD26P (P/E-selectina, cell signaling) y anti PAC (cell signaling) marcados con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) y PE respectivamente. Posteriormente fueron lavadas con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos y se analizaron mediante citometría de flujo (BD AccuriC6), de acuerdo a 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 y plaquetas no estimuladas sin marcar. Se realizaron tres ensayos independientes por duplicado y se utilizó como control negativo HCAEC y co-cultivo de células HCAEC y plaquetas sin estimular.

7.3.10 Cuantificación de Tromboxano A (TXA) en el modelo de co-cultivo estimulado con LPS y bacteria completa de P. gingivalis.

Después de la estimulación con LPS y bacteria completa del modelo 2 de co-cultivo, se obtuvo el sobrenadante, en cual de acuerdo a las indicaciones del fabricante del Kit, no requirió de ningún proceso adicional antes de la ELISA. La determinación del Tromboxano A₂ se realizó bajo el principio de ELISA competitiva mediante el kit Cayman Chemical item #501020. Para el desarrollo de la prueba se tuvo en cuenta todas las especificaciones del fabricante.

7.4 Hipótesis

- El lipopolisacárido y bacteria completa viva de *P. gintgivalis* induce activación y adhesión de plaquetas humanas en co-cultivo con HCAEC.
- El lipopolisacárido y bacteria completa viva de *P. gintgivalis* no induce activación, ni adhesión de plaquetas humanas en co-cultivo con HCAEC.

7.5 Plan de tabulación y análisis

Los datos se expresan en términos de porcentaje con respecto a la concentración evaluada. Cada barra representa el promedio de 3 ensayos independiente por duplicado, los valores de dispersión significa el error promedio estándar (ems). Se efectuó un análisis de varianza en cada punto de concentración y posteriormente la prueba de diferencias múltiples de Dunnet de acuerdo a la prueba de homogeneidad de varianzas. Se asumió como significativa una $p < 0,05$.

8. Consideraciones éticas

De acuerdo a la Guía 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 el Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque mediante el acta #11 del 03 de junio 2014 (anexo 1).

La obtención de plaquetas humanas se realizó en conformidad a los artículos 15 y 16 de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social para la aplicación del consentimiento informado por parte de la fundación Hematológica Colombiana, que bajo convenio firmado proveerá al proyecto las plaquetas humanas a partir de donantes voluntarios (anexo 2).

9. Resultados

9.1 Recuento Bacteriano

El número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL) obtenido para cada muestra, se calculó de acuerdo a lo descrito por Jongenburger *et al.*, (2010). Los resultados del análisis mostraron un comportamiento homogéneo para los recuentos de *P. gingivalis* W83. En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos de Bacteria completa de *P. gingivalis*. Se conservó el orden de magnitud de la potencia en base 10 obtenida en ensayos previos (10^9 UFC/mL), siendo comparable el valor del recuento obtenido experimentalmente con el que se usó como valor de referencia para hacer los cálculos para estimular las plaquetas (valor del recuento teórico).

Tabla 3. Recuentos de Bacteria completa de *P. gingivalis* W83.

Pg W83 = 620 nm				
Densidad óptica	Recuento 10-8	Recuento 10-7	Recuento 10-6	UFC/ mL
$0,903 \pm 0,003$	$2,642 \pm 1,73$	$27,923 \pm 8,0$	$263,15 \pm 39,72$	$2,68 \times 10^9 \pm 0,089$

* En la tabla se presenta la media \pm desviación estándar para quince experimentos con *P. gingivalis* W83.

Tabla 4. Comparación de Recuentos Teórico y Experimental de *P. gingivalis* W83.

Bacteria	Recuento Teórico	Recuento Experimental
Porphyromonas gingivalis (P.g W83)	4.7×10^9 UFC / mL	$2,68 \times 10^9 \pm 0,089$

9.2 Caracterización del LPS de *P. gingivalis* W83

A partir de un peso húmedo de bacteria completa para *P. gingivalis* se obtuvo 0,7 p/p y 0,4% p/p respectivamente de LPS, lo que indica que fue mayor el rendimiento obtenido para *P. gingivalis* w83. La caracterización del extracto de *P. gingivalis* W83 fue determinado según el perfil electroforético.

El quimiotipo del lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* W83 se clasificó como semi-rugoso (figura 5). La detección de proteínas contaminantes registró bandas para lipopolisacáridos comerciales con una masa cercana a 66 KDa, mientras que el lipopolisacárido obtenido para la bacteria después de la repurificación no presentó banda. Estos resultados son muy similares a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, lo que permite demostrar que la metodología implementada en este estudio, utilizando diferentes técnicas previamente reportadas para la extracción, purificación y caracterización de LPS, permitió la obtención de LPS de elevada pureza a partir de cultivos de bacteria completa de *P. gingivalis* W83.

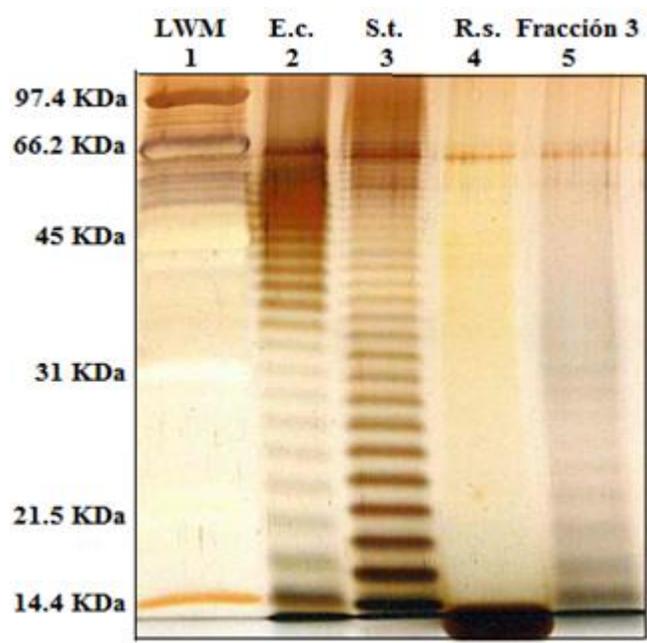


Figura 5. SDS-PAGE tinción plata: *Porphyromonas gingivalis* W83. Carriles: 1) Marcador de bajo peso molecular. 2) LPS comercial de *Escherichia coli* 0111:B4 (6 µg/pozo); 3) LPS comercial de *Salmonella tiphymurium* ATCC 7823 (6 µg/pozo); 4) LPS comercial de *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 (6 µg/pozo); 5) Fracción 3 - *Porphyromonas gingivalis* W83 (15 µg/pozo).

9.3 Efecto sobre la viabilidad celular de HCAEC estimuladas con LPS y Bacteria completa de *P. gingivalis* W83.

La viabilidad de células HCAEC estimuladas a dosis repetidas: dosis 1: durante 6h; dosis 2: durante 6h; dosis 3: durante 12h para un tiempo global de exposición de 24h con LPS (200 - 1.0 µg/mL) y bacteria completa de *P. gingivalis* W83 (MOI: 100-0,1) se vio afectada de manera

significativa en la máxima concentración evaluada de LPS (200 µg/mL) con 65% de actividad metabólica acorde con viabilidad celular (figura 6) en comparación frente al control (células sin estimular), mientras que la bacteria viva no produjo muerte en ninguno de los MOI evaluados lo que refleja que no se vio afectada la integridad celular del endotelio que mantienen porcentajes de supervivencia por encima del 97% (figura 7). El Tritón al 1% produjo el 100% de muerte celular siendo nuestro control positivo de muerte.

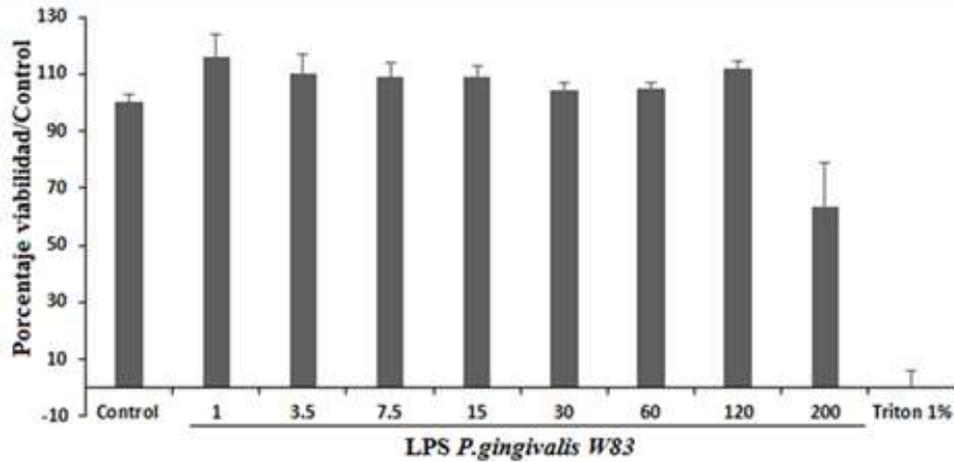


Figura 6. Viabilidad de células HCAEC estimuladas con LPS de *P. gingivalis* W83. Las HCAEC fueron estimuladas con LPS de *P. gingivalis* W83 (200-1,0µg/mL) por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular como control de viabilidad. Se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. *Cada barra representa la media en porcentaje ± e.s.m. de tres experimentos independientes por triplicado para cada tratamiento (n=3).

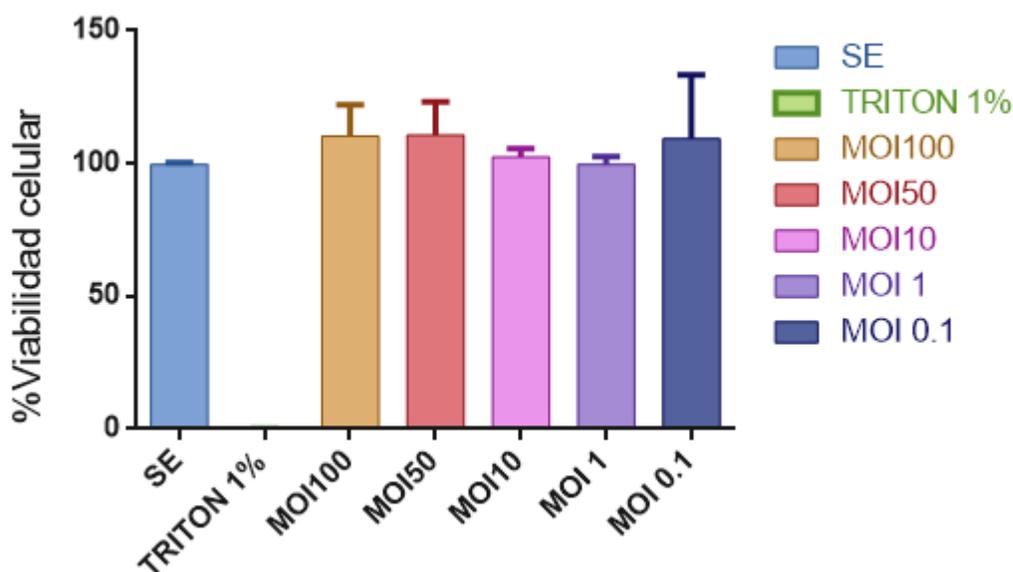


Figura 7. Viabilidad de células HCAEC estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83. Las HCAEC fueron estimuladas con bacteria completa (BC) de *P. gingivalis* W83 (MOI:100-0,1) por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular como 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).

9.4 Efecto sobre la viabilidad en plaquetas humanas estimuladas con LPS y Bacteria completa de *P. gingivalis* W83.

Los resultados demuestran que a las concentraciones máximas evaluadas (200 μ g/mL) de LPS, se induce muerte al 80% de la población plaquetaria ($p < 0,05$), mientras que a las demás concentraciones no se presenta muerte celular, presentándose valores de viabilidad celular muy similares a las producidas por el control sin estímulo (figura 8), los datos de viabilidad mediante microscopía de fluorescencia permiten demostrar la integridad de la plaqueta y se puede observar que induce una agregación de las plaquetas a las concentraciones entre 3,5 y 7,0 μ g/mL (figura 9). En relación a los resultados obtenidos con bacteria completa se puede observar que a los MOI evaluados no induce una citotoxicidad a la plaqueta a concentraciones de LPS de 1,0 μ g/mL y MOI 1 no hay cambios morfológicos ni se presenta agregación plaquetaria en los resultados por microscopía electrónica, datos muy similares a los presentados por las plaquetas sin estimular (figuras 10 y 11).

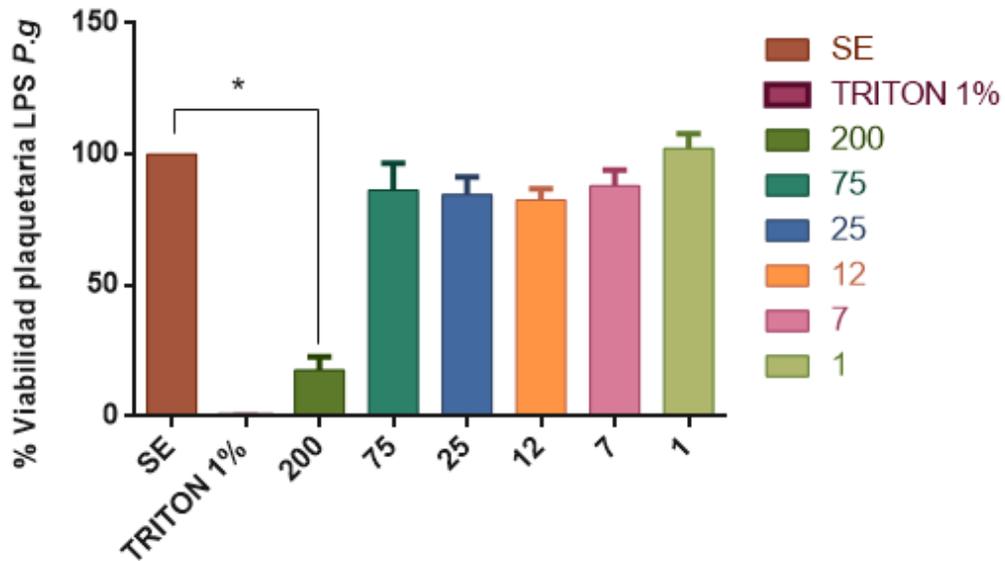


Figura 8. Viabilidad de plaquetas humanas estimuladas con LPS de *P. gingivalis* W83. Las plaquetas fueron estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83 (MOI:100-0,1) por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular como control de 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).

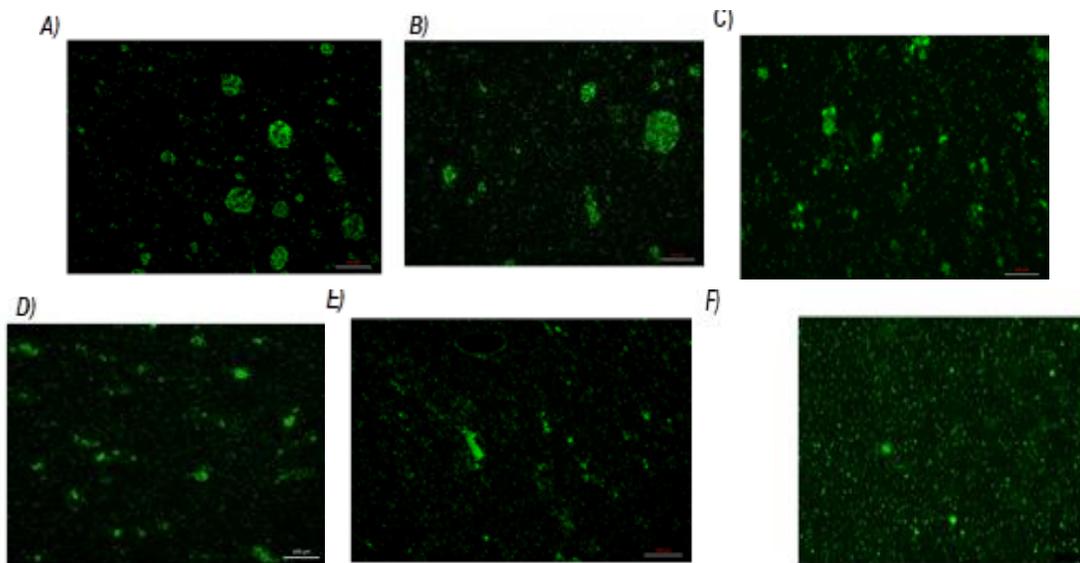


Figura 9. Viabilidad y toxicidad de plaqueta humanas estimuladas con LPS *P. gingivalis* W83. Plaquetas en suspensión en láminas portaobjetos estimuladas a diferentes concentraciones de LPS A) [100µg/mL], B) [75µg/mL], C) [25µg/mL], D) [7.0µg/mL], E) [1.0 µg/mL] y F) plaquetas sin estimular. La viabilidad celular fue evaluada por la conversión de calceína-AM a calceína (verde) mediada por la enzima intracelular esterasa mediante microscopía de fluorescencia.

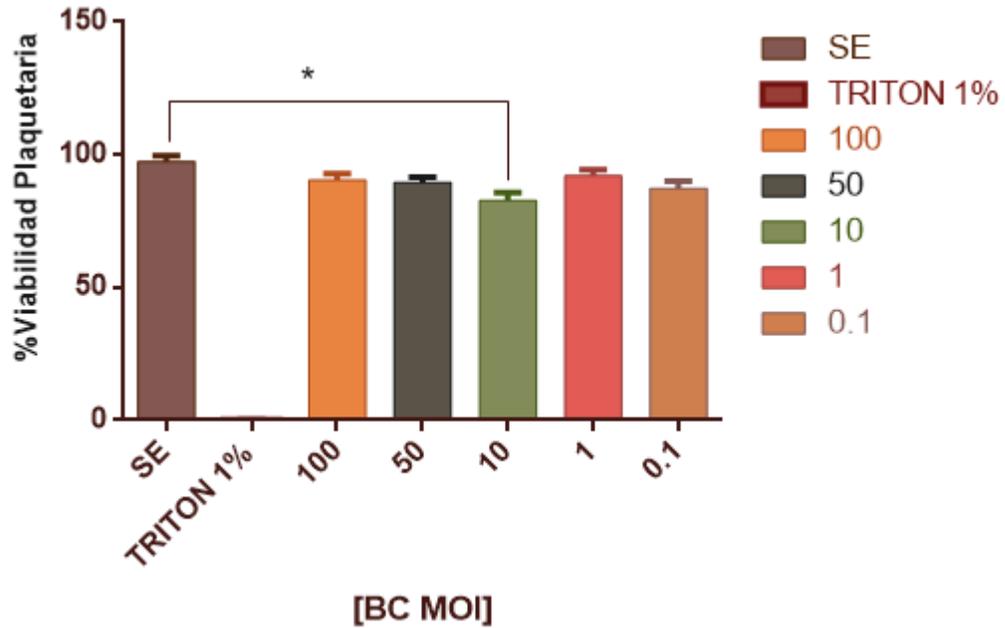


Figura 10. Viabilidad de plaquetas humanas estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83. Las plaquetas fueron estimuladas con bacteria completa (BC) de *P. gingivalis* W83 (MOI:100-0,1) por 24 h. El Tritón al 1% fue considerado nuestro control positivo de muerte celular y células sin estimular 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).

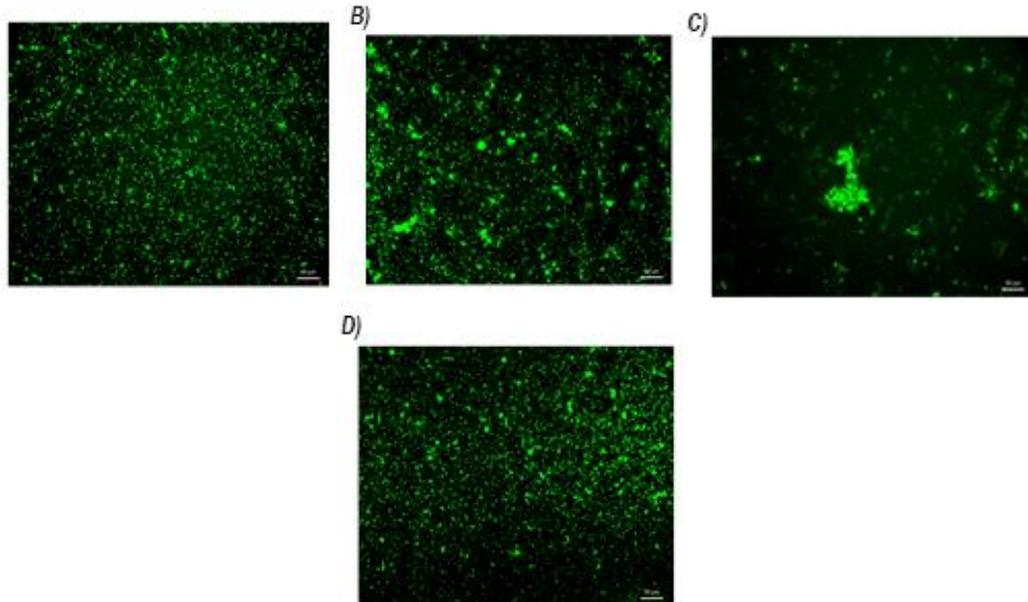


Figura11. Viabilidad y toxicidad de plaqueta humanas estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis* W83. Plaquetas en suspensión en láminas portaobjetos estimuladas a diferentes con MOI, A) MOI: 100 , P.g , B) MOI: 50 P.g C) MOI: 25 P.g , D) MOI: 50 P.g. La viabilidad celular fue evaluada por la conversión de calceina-AM a calceina (verde) mediada por la enzima intracelular esterasa mediante microscopia de fluorescencia.

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

Con el fin de poder identificar con cuál de los dos modelos propuestos se iba a continuar evaluado los objetivos de este trabajo; se realizó la identificación del gen COX-2 mediante RT-PCR debido a que esta molécula se produce de manera inductiva en procesos de infección. Nuestros resultados demostraron que el protocolo o modelo 2 de estudio en donde las plaqueta fueron estimuladas previamente con el LPS de *P. gingivalis* antes de ser co-cultivadas con HCAEC indujo un aumento de la expresión del COX-2 de 3,93 veces a la concentración de 7.0µg/mL y de 1,58µg/mL en comparación con el control que son células sin estimular pero en contacto con plaquetas humanas (figura 12).

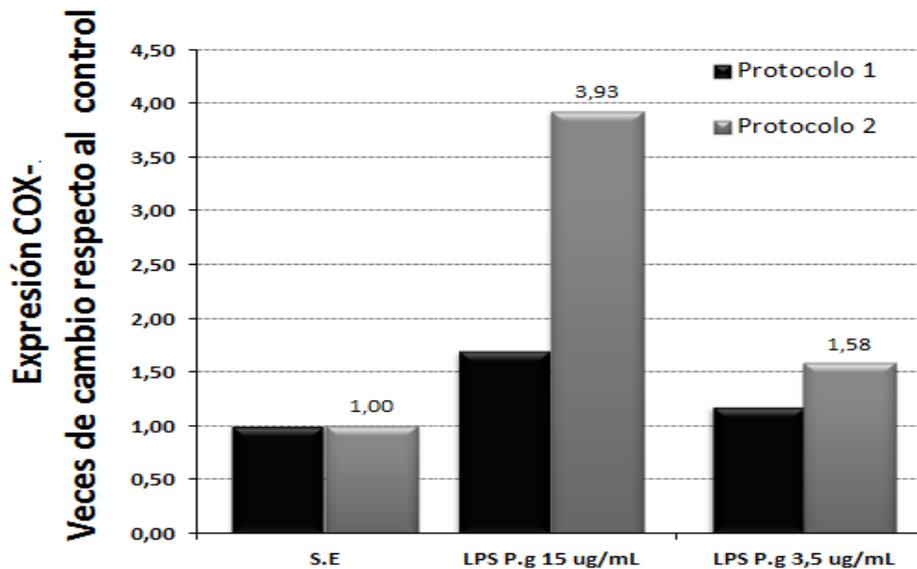


Figura12. Expresión de los genes de COX-2 en células HCAEC (n=2 por tratamiento). Se realizó la evaluación del RNAm en HCAEC estimuladas con LPS de *P. gingivalis* de acuerdo a los tratamientos preestablecidos. Se usó la técnica de RT-PCR SYBR Green para la cuantificación del RNAm. Los resultados muestran las veces de cambio de la expresión del receptor con respecto al grupo control sin estímulo. Se realizaron experimentos independientes por duplicado.

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

Nuestros resultados de expresión de marcadores de activación plaquetaria (PAC), demuestra que el lipopolisacárido de *P. gingivalis* W83 a concentraciones de 3.5 y 7,0µg/mL aumentaron la activación de PAC en un 9% y 9,5% respectivamente al igual que bacteria completa a dosis única MOI: 100 en un 4,5% en comparación con las plaquetas sin estimular 0,9% (figura 13) de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Respecto a la molécula de adhesión P/E-selectina se demostró que el LPS de *P. gingivalis* indujo la expresión en plaquetas de esta molécula al ser estimuladas con bacteria completa a dosis única MOI:100 a un 36% y con LPS a 7,0µg/mL a 12% en comparación con el control en 8,3%. Cabe resaltar que esta molécula se expresó de manera constitutiva en células y co-cultivo sin estimular, siendo mayor la expresión en el co-cultivo (10%) (Figuras 14 y 15).

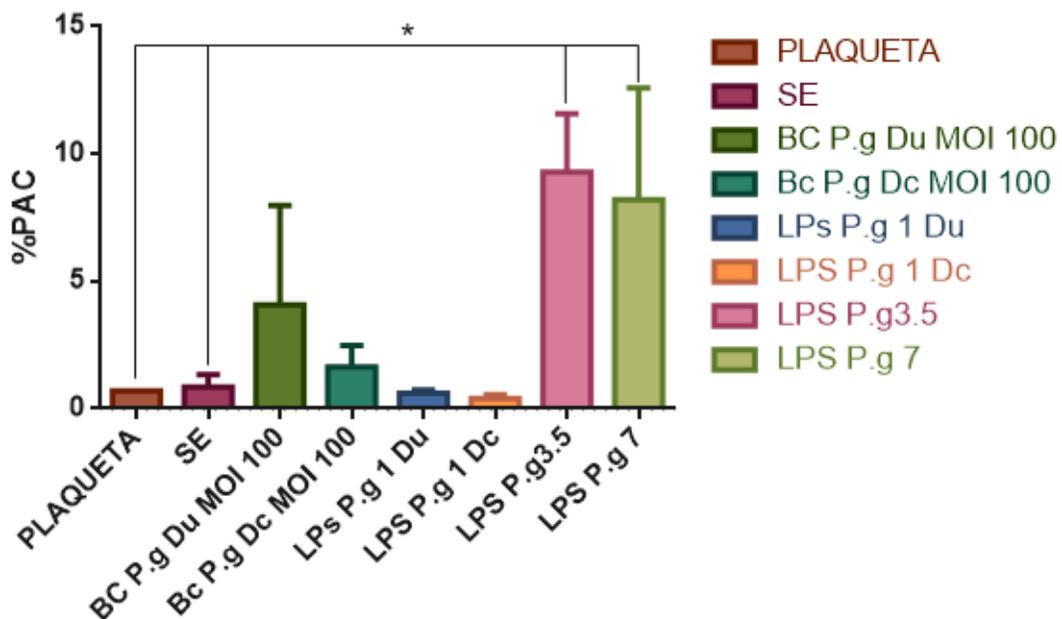


Figura 13. Expresión de PAC en plaquetas humanas estimuladas con LPS (1,0, 3,5 y 7,0µg/mL) y BC MOI: 100 a dosis única y repetida de *P. gingivalis*. Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; * $p < 0,05$ con respecto control plaquetas y co-cultivo sin estimular.

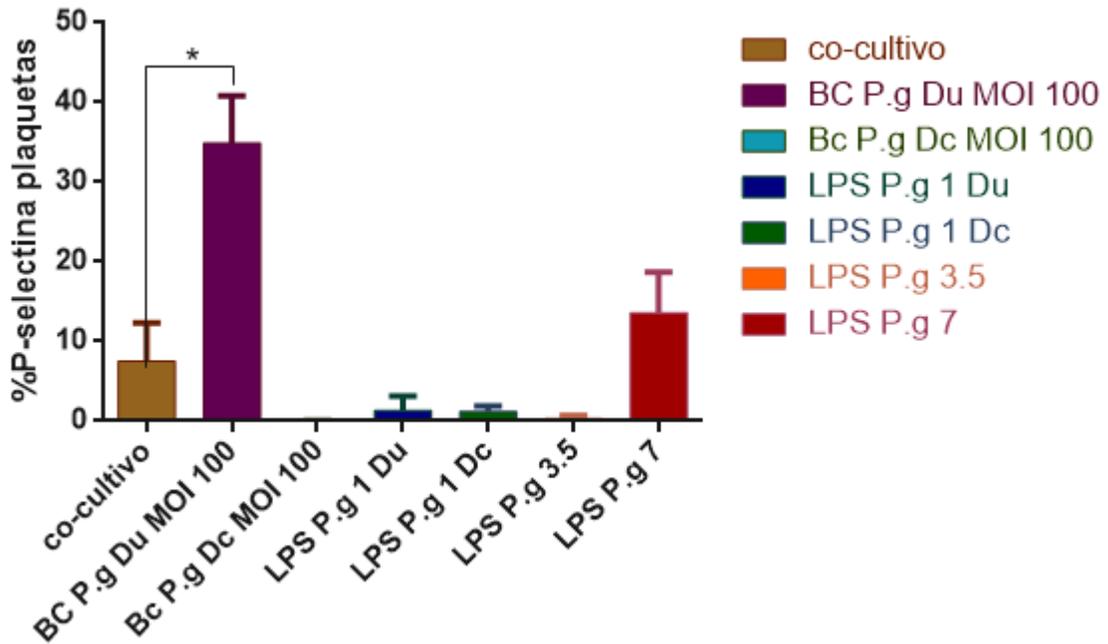


Figura 14. Expresión de P/E-selectina en plaquetas humanas estimuladas con LPS (1,0, 3,5 y 7,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BC MOi: 100 a dosis única y repetida de *P. gingivalis*. Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; *p<0,05 con respecto control plaquetas y co-cultivo sin estimular.

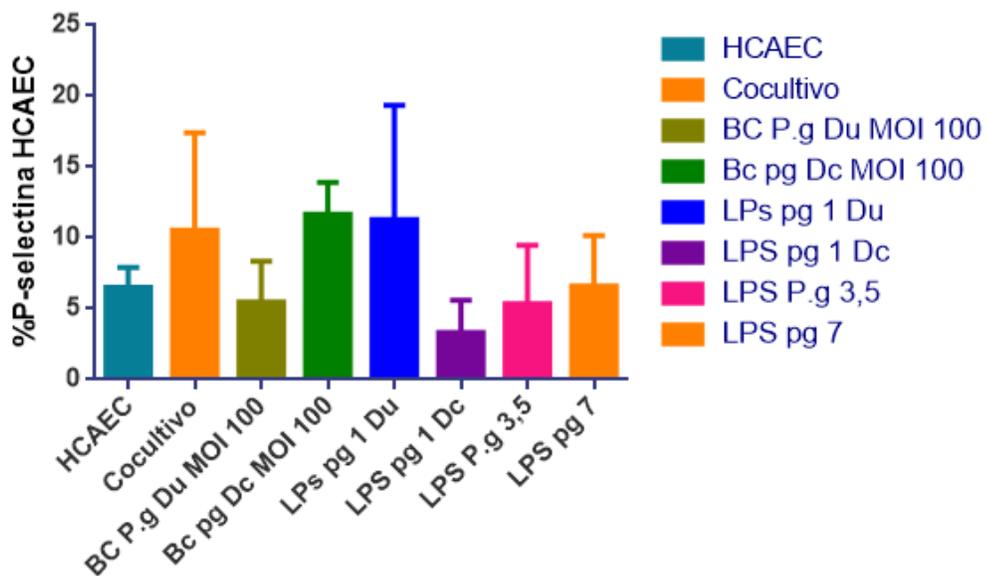


Figura 15. Expresión de P/E-selectina en células HCAEC estimuladas con LPS (1,0, 3,5 y 7,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BC MOi: 100 a dosis única y repetida de *P. gingivalis*. Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; *p<0,05 con respecto control HCAEC y co-cultivo sin estimular.

9.7 Cuantificación de niveles de Tromboxano A2 en el modelo de co-cultivo de HCAEC y plaquetas humanas estimuladas con LPS y bacteria completa de *P. gingivalis*.

En relación a la producción de tromboxano A2, nuestros resultados permitieron demostrar que el LPS de *P. gingivalis* indujo un aumento de los niveles de TBX-A2 en el sobrenadante del modelo de co-cultivo a la concentración de 1µg/mL a dosis única de un valor de 386 pg/mL y a la máxima concentración a dosis repetidas 7,0µg/mL a 216 pg/mL en comparación con los controles: células (1,69 pg/mL) y co-cultivo (1,57 pg/mL) sin estimular ($p \leq 0,05$). Con respecto al estímulo de bacteria completa sobre el co-cultivo no se evidencio cambios en los niveles de TBX-A2 en relación a los controles.

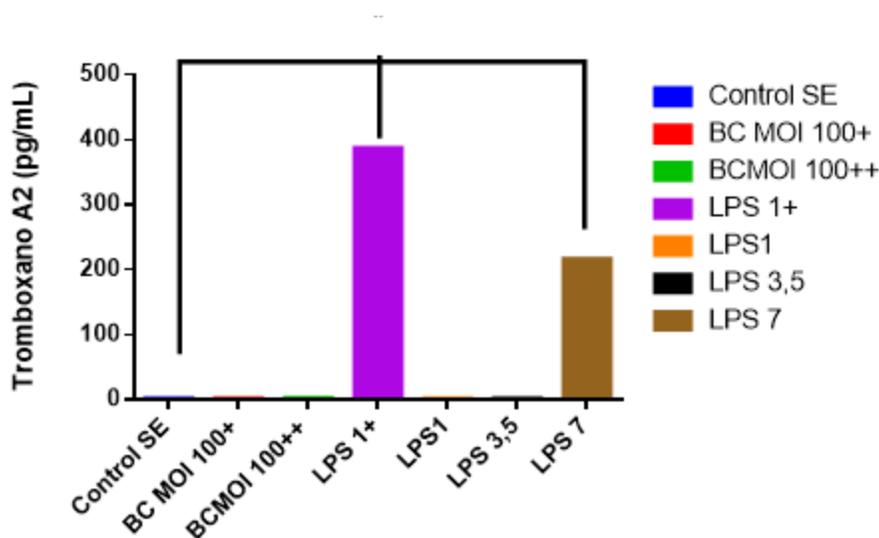


Figura 16. Expresión tromboxano A2 en células HCAEC estimuladas con LPS (1,0, 3,5 y 7,0µg/mL) y BC MOi: 100 a dosis única y repetida de *P. gingivalis*. Cada barra representa el promedio e.s.m. de n=3; * $p < 0,05$ con respecto control HCAEC y co-cultivo sin estimular.

10. Discusión

En este estudio se evaluó el efecto de bacteria completa y lipopolisacárido de *P. gingivalis* W83 en la activación y adhesión de plaquetas humanas en co-cultivo con células de arteria coronaria humana (HCAEC).

P. gingivalis ha sido reportada por varios investigadores, puede contribuir a la enfermedad cardiovascular a través de la invasión de células endoteliales, lo que podría perturbar los procesos de la célula huésped y proporcionar un nicho de protección contra los mecanismos de eliminación del huésped (Stach et al., 2012). El primer informe sobre la invasión de *P. gingivalis* se realizó en células endoteliales aórticas bovinas, células endoteliales del corazón de bovinos fetales y células endoteliales de la vena umbilical humana, demuestra que *P. gingivalis* tiene la capacidad de persistir dentro de esta célula huésped y posiblemente alterar la integridad celular (Stach et al., 2012).

Según reportes con bacteria completa, *P. gingivalis* han sido estudiado en modelos cardiovasculares in vitro a MOI: 100 ya que por consideración de los autores se obtienen mejores efectos fisiopatológicos sobre el endotelio vascular arterial y venoso principalmente (Chou H-H et al, 2018) Nuestros datos demostraron que tanto el LPS y la bacteria completa de *P. gingivalis* a MOI: 100 no representan ningún efecto considerable que comprometa la viabilidad plaquetaria y celular. Resultados ampliamente respaldados por estudios realizados en diversas líneas endoteliales HCAEC o HUVEC, en el que se destaca el trabajo realizado por Paolo Rodrigues y colaboradores en el 2012, al demostrar que diferentes cepas *P. gingivalis* como W83, A7436, 381 y 33277 no mostraron diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de muerte celular entre cultivos HCAEC infectados y no infectados al exhibir menos de un 10% de muerte celular a 24 y 48 h de exposición (Rodriguez et al 2012). Es importante destacar que estos resultados son muy comparables con los nuestros ya que además de incluir la cepa *P. gingivalis* W83, estos datos también se obtuvieron bajo la misma metodología de la actividad esterasa calceina AM a calceina fluorescente junto con la evaluación de integridad de membrana, metodología que también empleamos en nuestro estudio.

En la actualidad el único reporte en células endoteliales con concentraciones de LPS mayores a 2 µg/mL fue el realizado por el investigador Krishnamurti C *et al.*, (2002), a partir de LPS de entéricas determinado la adhesión plaquetaria sobre células endoteliales HUVEC ante LPS de *E. coli* (2,0 y 10 µg/mL) por 4 h y virus dengue-2 por 96 h sin comprometer la

viabilidad endotelial. Según mediciones en los niveles serológicos de LPS de pacientes con sepsis hay una mínima o ninguna toxicidad directa en células HUVEC e incluso en células endoteliales de grandes vasos (Hu X et,al 1998). En contraste, el bloqueo en la expresión de los genes inducidos por la exposición a LPS de *E. coli* resulto en la muerte de la célula endotelial. De esta manera otros estudios como el realizado por Xiaolong Hu *et al.*, (1998), también concluyen que LPS no genera muerte en cultivos de células endoteliales humanas ya que incluso en células endoteliales micro-vasculares humanas mostraron la misma resistencia a la toxicidad del LPS en endotelios de grandes vasos (Hu X et,al 1998). Nuestros resultados en relación a la viabilidad a dosis repetidas de estimulación con LPS y bacteria completa de *P. gingivalis* no se encuentran a la fecha descritas por literatura; abriendo nuevas perspectivas para la investigación en modelos crónicos celulares que permitan comprender diferentes mecanismos en el desarrollo y progresión de las enfermedades cardiovasculares y su asociación con la enfermedad periodontal.

En relación a nuestro modelo de co-cultivo en células HCAEC y plaquetas humanas; dentro de la literatura científica no existen evidencias, lo que permite demostrar que este modelo sería de gran impacto para poder identificar claramente los mecanismos moleculares que se pueden presentar entre la disfunción endotelial y adhesión, activación y agregación plaquetaria que induce un proceso aterosclerótico asociado a la infección por periodontopatógenos como *P. gingivalis*. En modelos de co-cultivo con células HUVEC y plaquetas se evaluó el efecto de *E coli* con el fin de poder determinar las interacciones que se pueden presentar a nivel de receptores entre células endoteliales y plaquetas los resultados demostraron un leve aumento de P/E- selectina, VECAM e ICAM en células pero no en plaquetas, en comparación con nuestros resultados que si evidenciamos cambios en la expresión de PAC y P/E-selectiva en plaquetas lo que indica que E- selectina se puede estar expresando en el endotelio activado por la liberación de citosinas como IL6, IL8 ya descrita por otros autores en esta línea células (Thomas et,al 2008) y la P-selectina en los gránulos alfa plaquetarios de las plaquetas activadas lo que a su vez ejerza un efecto sinérgico sobre la adhesión leucocitaria y la transmigración (Thomas et,al 2008).

Estudios realizados por (Nicu et al.,2009) evaluaron especies de bacterias como *A. actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis* en pacientes con periodontitis donde evidencian que

estas bacterias afectan de manera diferente la activación de las plaquetas, y evaluaron mediante la exposición a P-selectina, CD63 y la unión de PAC-1 en plaquetas de pacientes y controles, la exposición de P-selectina fue aumentando comparado con los controles. Por lo que nuestros resultados podrían estar asociados a que *P. gingivalis* y el lipopolisacárido podría estar determinando la expresión de marcadores de activación plaquetaria en este caso de PAC por la unión de las plaquetas que exponen la P-selectina a los monocitos.

La mayoría de estudios continúan apoyando la idea de que las plaquetas tienen un papel en la inflamación y que el TLR4 también puede regular la función hemostática de las plaquetas. El tratamiento con LPS *in vitro* aumenta CD63 plaquetaria, aumenta la agregación inducida por agonistas a través de TLR4 y que se encuentra involucrada con la disminución de la producción de óxido nítrico, el aumento de cGMP celular y la activación de proteína Kinasa (Beaulieu et al 2010) por lo que nuestros resultados podrían estar asociados a que el LPS de *P. gingivalis* podría estar actuando mediante el receptor TLR4 activando algunas de las vías que induce la adhesión, activación y subsecuente agregación plaquetaria, por lo cual se requiere de nuevos estudios que permitan determinar el posible mecanismo por el cual el LPS de *P. gingivalis* induce estos efectos.

En relación al efecto que presenta el LPS de *P. gingivalis* sobre la producción de Tromboxano A₂ en el modelo de co-cultivo, sugiere que el LPS puede inducir la liberación de tromboxano A₂ (TxA₂) favoreciendo el infiltrado de células inflamatorias, la adhesión y agregación plaquetaria lo cual promueve la formación de células espumosas en la íntima vascular (Armitage et al., 2008). A su vez el LPS puede aumentar la producción de IL-1, que inducen la liberación de este factor desde las células endoteliales, generando la agregación de plaquetas y focos inflamatorios donde se puede generar un trombo [56].

11. Conclusiones

- La activación endotelial principalmente ante bacteria viva de *P. gingivalis* W83 refleja que la respuesta endotelial puede ser influenciada por el número de dosis a la que se expone el endotelio, respaldando que la exposición *in-vitro* a más a una dosis (repetida) podría conducir a una mejor comprensión para estudiar la disfunción endotelial y la activación pro inflamatoria inducida por periodontopatogenos.
- El modelo de co-cultivo de células HCAEC y plaquetas humanas permitió determinar la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina, y PAC en plaquetas humanas estimuladas con LPS de *P. gingivalis* a la concentración de 7 µg/mL, Lo que sugiere que este periodontopatógeno juegan un papel relevante en la interacción plaqueta-célula endotelial que conlleva a la producción y progresión de los procesos ateroscleróticos.
- El LPS de *P. gingivalis* induce un aumento de la producción de los niveles de tromboxano A2 en el modelo de co-cultivo de plaquetas humanas y HCAEC lo que sugiere que esta endotoxina puede conllevar a la adhesión, activación y agregación plaquetaria mediante la vía asociada a tromboxano A2.

12. Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias por la convocatoria para proyectos de ciencias, tecnología e innovación en salud 657-2014 junto con la vicerrectoría de investigaciones de la Universidad el Bosque, mediante el proyecto titulado “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*”. Código: 130865740864, contrato 598 de 2014.

13. Referencias bibliográficas

Armitage G. Periodontology/Oral Medicine: Periodontal infections and cardiovascular disease-how strong is the association? Oral Dis [Internet]. noviembre de 2008 [citado el 25 de octubre de 2018];6(6):335-50. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355266>.

Badimón L, González J. Disfuncion endotelial. Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6(A):21-30 - Vol. 6 Núm.Supl.A DOI: 10.1157/13087918

Beaulieu LM, Freedman JE. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. Thromb Res [Internet]. NIH Public Access; marzo de 2010 [citado el 25 de octubre de 2018];125(3):205-9. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945154>

Bombeli T, Schwartz B, Harlan J, Adhesion of Activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), α v β 3 Integrin, and GPIIb.

Champaiboon, Chantrakorn et al. Differential inflammasome activation by Porphyromonas gingivalis and cholesterol crystals in human macrophages and coronary artery endothelial cells. Atherosclerosis, Volume 23 , Issue 1 , 38 - 44.

Chou H-H, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, Gibson FC, et al. Porphyromonas gingivalis Fimbria-Dependent Activation of Inflammatory Genes in Human Aortic Endothelial Cells. Infect Immun [Internet]. el 1 de septiembre de 2005 [citado el 25 de octubre de 2018];73(9):5367-78. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113252>.

Flores-Rivera OI, Meza-Márquez JM, Nava-López JA, Ramírez-Morales K. Fisiología de la coagulación. Rev Mex Anestesiología. 2014;37:S382-6.

García Mesa M, Coma Alfonso C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Rev Cuba Angiol y Cir Vasc [Internet]. 2000;1(2):132-41. Recuperado a partir de: http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol1_2_00/ang08200.pdf

Geismar K, Stoltze K, Sigurd B, Gyntelberg F, Holmstrup P. Periodontal disease and coronary heart disease. *J Periodontol* 2006 Sep;77(9):1547-1554.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000 1997 Jun;14:112-143.

Glurich I, Grossi S, Albini B, Ho A, Shah R, Zeid M, et al. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 Mar;9(2):425-432.

Gotsman I, Lotan C, Soskolne WA, Rassevsky S, Pugatsch T, Lapidus L, et al. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol* 2007 May;78(5):849-858.

Gualtero, G., Porras, P., Sebastián, B., Buitrago, D., and Castillo, D. (2014). Purificación y caracterización de lipopolisacáridos de *Eikenella corrodens* 23834 y *Porphyromonas gingivalis* W83. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XVI, 34–44.

Hayashi C, Gudino CV, Gibson FC,3rd, Genco CA. Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *Mol Oral Microbiol* 2010 Oct;25(5):305-316.

Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, 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.

Hu X, Yee E, Harlan JM, Wong F, Karsan A. Lipopolysaccharide induces the antiapoptotic molecules, A1 and A20, in microvascular endothelial cells. *Blood* 1998 Oct 15;92(8):2759-2765.

Iwai T. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *J Periodontal Res* 2009 Dec;44(6):689-694.

Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol* 2000 2010 Oct;54(1):53-70.

Janket S-J, Baird A, Chuang S, Jones JA. (2003). Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 95: 559-569.

Jongenburger I, Reij MW, Boer EPJ, Gorris LGM, Zwietering MH. Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food. *Int J Food Microbiol* [Internet]. el 30 de septiembre de 2010 [citado el 25 de octubre de 2018];143(1-2):32-40. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724016>.

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.

Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. (2010). "Gum bug, leave my heart alone" epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res*; 89(9):879-902.

Khlgatian M, Nassar H, Chou HH, Gibson FC, 3rd, Genco CA. Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 2002 Jan;70(1):257-267

Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, MacKenzie D, Shearer B. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol* 2005 Jul;32(7):708-713.

Lafaurie GI, Mayorga-Fayad I, Torres MF, Castillo DM, Aya MR, Baro?n A, Hurtado PA. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 873-879.

Listgarten MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *J Periodontal Res* 1987 May;22(3):172-178.

Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2012 May 22;125(20):2520-2544.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000 Oct;71(10):1528-1534.

López F Rodrigo, Oyarzún M Marcela, Naranjo C Claudia. Asociación entre periodontitis y enfermedad cardiovascular. *Rev. méd. Chile* [Internet]. 2000 Nov [citado 2017 Sep 21]; 128(11): 1295-1296.

Lourbakos, Yuan, Jenkins, Travis, Andrade-Gordon, Rosemary Santulli, Jan Potempa, and Robert N. Pik. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. 2001 by The American Society of Hematology.

Lund DD, Brooks RM, Favori FM, Heisted DD. (2007). Role of angiotensin II in endothelial dysfunction induced by lipopolysaccharide in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 293:H3726-H3731.

Mattila KJ, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL. Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993 Nov;103(2):205-211.

Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. 2007: *J Periodontol*; 78(12):2289-302.

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.

Nicu EA, Van der Velden U, Nieuwland R, Everts V, Loos BG. Elevated platelet and leukocyte response to oral bacteria in periodontitis. *J Thromb Haemost.* 2009 Jan;7(1):162-70. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03219.x.

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ. (2001). De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*; 72:1221-7.

Offenbacher S, Madianos PN, Champagne CM, Southerland JH, Paquette DW, Williams RC, et al. Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *J Periodontal Res* 1999 Oct;34(7):346-352.

Orrego M, Parra M, Salgado Y, Muñoz E, Fandiño V. Porphyromonas gingivalis and systemic diseases. *Revista CES Odontología* ISSN 0120-971X Volumen 28 No. 1 Primer Semestre de 2015.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.*; 8: 217-25.

Rodrigues PH, Reyes L, Chadda AS, Bélanger M, Wallet SM, Akin D, et al. Porphyromonas gingivalis Strain Specific Interactions with Human Coronary Artery Endothelial Cells: A Comparative Study. *PLoS One*. 2012;7(12).

Rodríguez Rodríguez I. Hemostasia Introducción. [citado el 25 de octubre de 2018]. Recuperado a partir de: <https://docplayer.es/20202526-Hemostasia-1-introduccion-inmaculada-rodriguez-rodriguez-tema.html>

Rojas Campos N. El lipopolisacarido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas recientes avances en estructura, genética y bioquímica. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Rosado A., Hernández Marcos G., Pérez Gómez R.M.P.. Evidencias científicas de la relación entre periodontitis y enfermedades cardiovasculares. *Avances en Periodoncia* [Internet]. 2008 Dic [citado 2017 Sep 21] ; 20(3): 173-181.

Rurenga P, Raangs E, Singadji Z, Wekema-Mulder G, Veloo AC, van Winkelhoff AJ. Evaluation of three selective media for isolation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2013 Oct;48(5):549-552.

Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988 Oct 29;2(8618):983-986.

Silipo A, Erbs G, Shinya T, Maxwell Dow JM, Parrilli M, Lanzetta R, et al. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*. 2009;20(4):406-19.

Slade GD, Ghezzi EM, Heiss G, Beck JD, Riche E, Offenbacher S. (2003). Relationship between periodontal disease and C-reactive protein among adults in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Arch Intern Med.*; 26 (163):1172-9.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992 Apr;63(4 Suppl):322-331.

Stach K, Nguyen XD, Lang S, Elmas E, Weiss C, Borggrefe M, Fischer J, Kälsch T. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiol J*. 2012;19(1):20-8

Stoll LL, Denning GM, Weintraub NL. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Dec;24(12):2227-2236.

Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 2007 Mar 1;356(9):911-920.

Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C & Stefanadis C. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis*, (2011);219(1): 1-9.

Wostern-van RM, Lutter R, Specht AC, Woensel JB, Vander Loors CM, Florquin S, Lachmant B, Bos AP. (2010). Ventilator-Induced Inflammatory Response in Lipopolysaccharide-Exposed Rat Lung Is Mediate by Angiotensin-Converting Enzyme. *The American Journal of Pathology.*; 176(5): 2219-29.

14. ANEXOS



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 Lipopolisácarido 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 período 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 el 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 período 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.

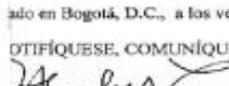
ACUERDA

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.

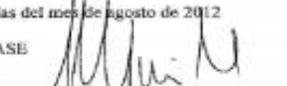
JORGE ARI NORIEGA ALVARADO	Experto en Metodología de la Investigación
NADIA YADIRA CASTAÑEDA GARCÍA	Investigadora
BORIS JULIÁN PINTO BUSTAMANTE	Experto en Bioética
LILIANA OVIEDO ALBÁN	Representante de la Comunidad
JAIRO ANDRÉS MARTÍNEZ JIMÉNEZ	Farmacólogo
MARÍA CRISTINA MEJÍA GAVILANES	Representante 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

OTIFÍQUESE, COMUNÍQUESE Y CUMPLASE


JAIME ESCOBAR TRIANA
Presidente (E) Consejo Directivo




JUAN GUILLERMO MARÍN MORENO
Secretario – Consejo Directivo

**CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA INTERINSTITUCIONAL CELEBRADO
ENTRE LA
FUNDACION HEMATOLOGICA 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 ~~veinticho~~ 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 HEMATOLOGICA
COLOMBIA**

LA UNIVERSIDAD


UNIVERSIDAD
EL BOSQUE

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

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 FIRME 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 _____.”