

**EFFECTO DEL ÁCIDO CAFEICO SOBRE LA AGREGACIÓN
PLAQUETARIA VÍA COX2 INDUCIDA POR *Porphyromonas gingivalis*.**

Desarrollado en el marco de la investigación docente:

**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 *Porphyromonas gingivalis*”**

Elaborador por la Docente Investigadora:

Diana Marcela Buitrago Ramírez

**Profesor Titular Instituto UIBO
Vicerrectoría de Investigaciones
Área Básica Facultad de Enfermería
Universidad El Bosque**

Presentado como requisito parcial de grado por la estudiante:

LAURA DANIELA ARIZA REYES

**Universidad El Bosque
Facultad de Enfermería
Bogotá D.C, junio 2022.**

**EFFECTO DEL ÁCIDO CAFEICO SOBRE LA AGREGACIÓN
PLAQUETARIA VÍA COX2 INDUCIDA POR *Porphyromonas gingivalis*.**

Desarrollado en el marco de la investigación docente:

**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 *Porphyromonas gingivalis*”**

Elaborador por la Docente Investigadora:

Diana Marcela Buitrago Ramírez

**Profesor Titular Instituto UIBO
Vicerrectoría de Investigaciones
Área Básica Facultad de Enfermería
Universidad El Bosque**

Presentado como requisito parcial de grado por la estudiante:

LAURA DANIELA ARIZA REYES

**Universidad El Bosque
Facultad de Enfermería
Bogotá D.C, junio 2022**

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS	8
Objetivo general:	8
Objetivos específicos:	8
PROPOSITO	9
JUSTIFICACIÓN	10
ASPECTOS GENERALES	11
Descripción del proyecto	11
Localización y duración del proyecto	11
1. Revisión bibliográfica:	12
2. Fase Experimental:	12
3. Apoyo en otros proyectos de investigación:	13
MARCO TEORICO	14
1. Morfología plaquetaria:	14
2. Estructura de las plaquetas:	14
3. Fisiología plaquetaria:	15
4. Rutas metabólicas de la agregación plaquetaria:	15
5. Hemostasia primaria:	17
6. Agregación plaquetaria y aterosclerosis	18
7. Arteriosclerosis:	19
8. Enfermedad periodontal y arteriosclerosis:	19
9. Patógenos periodontales y efectos proagregantes	20
10. Polifenoles y efectos antiagregantes:	21
11. Western Blot:	22
MARCO METODOLOGICO	28
1. Preparación del inculo bacteriano de <i>P. gingivalis</i> W83.	28
2. Obtención y preparación de la suspensión de plaquetas humanas.	28

3. Estimulación plaquetaria con la bacteria completa de <i>P. gingivalis</i> y exposición al ácido cafeico.	28
4. Evaluación de la viabilidad celular mediante el método de Calceína AM:	29
5. Estandarización de la técnica de Western blot para identificación de COX2. ..	29
6. Determinación del efecto del ácido cafeico sobre la expresión de COX2 en la suspensión de plaquetas estimuladas con <i>P. gingivalis</i>	30
RESULTADOS	31
1. Efecto del ácido cafeico sobre la viabilidad plaquetaria estimuladas con bacteria completa de <i>P. gingivalis</i>	31
2. Protocolo de estandarización del ensayo de western blot para la identificación de COX2 mediante western blot.	32
3. Determinación del efecto del ácido cafeico sobre la expresión de COX2 en plaquetas estimuladas con <i>P. gingivalis</i>	34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

Contenido de Figuras

Figura 1. Esquema de la estructura de las principales y receptores de la membrana plaquetaria.	15
Figura 2. Transducción de la señal durante la activación plaquetaria	17
Figura 3. A) Arteria normal y B) Arteria con acumulación de placa	19
Figura 4. Mecanismos de periodontopatógenos para aterosclerosis	21
Figura 5. Aminoácidos primarios	23
Figura 6. Montaje para realizar electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	24
Figura 7. Montaje de transferencia a membrana	25
Figura 8. Esquema de detección de bandas por métodos colorimétricos, fluorimétricos o luminiscentes	27
Figura 9. Viabilidad de suspensión plaquetaria infectada con <i>P. gingivalis</i> W83 y expuestas al compuesto ácido cafeico (50, 25, 5 μ M) mediante el método de Calceina AM.	31
Figura 10. Estandarización de la técnica de western blot para la identificación de la expresión de COX2 en plaquetas humanas.....	33
Figura 11. Estandarización de la expresión de COX2 en plaquetas humanas estimuladas con ácido araquidónico (20 μ M).	33
Figura 12. Efecto del ácido cafeico a las concentraciones evaluadas	34

Contenido de Tablas

Tabla 1. Cronograma	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Estadios de la periodontitis y condiciones Periodontales	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3.. Grados de la periodontitis y condiciones Periodontales.	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Las enfermedades periodontales son infecciones caracterizadas por la presencia de más de 200 especies bacterianas, que por infección metastásica, pueden llegar a diferentes órganos y ocasionar cambios patológicos [1], en los últimos años la posible relación entre enfermedades periodontales y enfermedades cardiovasculares se ha convertido en un tema de mayor interés, se han establecido grupos de microorganismos específicos para esta afección, especialmente las bacterias anaerobias denominadas patógenos periodontales.

Asimismo se evidenció los efectos potenciales de la enfermedad periodontal sobre el sistema cardiovascular, por lo cual se generan unos interrogantes: ¿puede la infección bacteriana periodontal estar relacionada con arterosclerosis?, esta pregunta varios autores ya la han contemplado y confirmado pero ¿qué mecanismo utiliza para la agregación plaquetaria? y ¿cómo se puede prevenir?

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) de la Universidad El Bosque, ha realizado estudios para esta asociación, encontrando relación de algunos patógenos con enfermedades periodontales pero bueno hablemos un poco acerca de los compuestos fenólicos que son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal y en los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad [2]. Esta revisión presenta información sobre las rutas metabólicas de la agregación plaquetaria, la relación de la enfermedad periodontal con la agregación plaquetaria, los efectos antiagregantes de los polifenoles y efecto del ácido cafeico sobre la agregación plaquetaria mediante la expresión de COX2 inducida por *Porphyromonas gingivalis*.

Palabras clave: agregación plaquetaria, *Porphyromonas gingivalis*, Ácido cafeico, rutas metabólicas, ciclooxigenasa (COX-2).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del compuesto ácido cafeico sobre la agregación plaquetaria vía COX2 inducida por la bacteria completa de *P. gingivalis*.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto del ácido cafeico sobre la viabilidad de plaquetas humanas estimuladas con *P. gingivalis*.
2. Realizar la estandarización de la técnica de western blot para análisis de COX2 en plaquetas humanas.
3. Determinar el efecto del ácido cafeico sobre la expresión de COX2 inducida por la bacteria completa de *P. gingivalis*.

PROPOSITO

La prevención es la ejecución de acciones o medidas que implementa el personal de salud o la población según Rodríguez et al [3]; es decir que el profesional de la salud es el máximo responsable de la efectividad preventiva. Ahora bien teniendo esto en cuenta Enfermería es un actor principal en esta área, la prevención y el diagnóstico a tiempo pueden evitar el desarrollo de enfermedades graves que incluso pueden causar la muerte.

En la investigación que se llevó a cabo se logra evidenciar que periodontopatógenos presentan una correlación con la arteriosclerosis, esta última es una afección frecuente que aparece cuando los periodontopatógenos como *P. gingivalis* y sus endotoxinas se acumula en el interior de las arterias, vale la pena resaltar que las enfermedades relacionadas con la aterosclerosis son la principal causa de muerte en los Estados Unidos.

Por este motivo desde enfermería es de vital importancia valorar la salud oral, encontrar la asociación directa en pacientes que presentan un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) y fomentar la higiene oral.

JUSTIFICACIÓN

La periodontitis es considerada un factor de riesgo del inicio de progresión de las enfermedades cardiovasculares principalmente asociadas a los procesos ateroscleróticos, una de las patologías con mayor tasa de morbilidad a nivel mundial [4]. Dentro de los periodontopatógenos más comúnmente relacionados con esta asociación se encuentra *P. gingivalis*, pero también hay otras bacterias como *Streptococcus sanguis* que tienen la capacidad de inducir la activación y agregación plaquetaria in vitro y en estudios con animales y seres humanos, la activación de las plaquetas produce la liberación de mediadores proinflamatorios y la exposición de los receptores proinflamatorios, que da como resultado la unión de plaquetas a las células endoteliales y leucocitos, esto conlleva a que las plaquetas sean participantes activas de las reacciones trombóticas como inflamatorias a través de la vasculatura [5]

Estudios previos realizados por Medina y cols, [6] demostraron que el lipopolisacárido y la bacteria completa de *P. gingivalis* producen agregación plaquetaria mediante los agonistas ADP, U46619 (análogo del tromboxano A₂) y del ácido araquidónico, así mismo el estudio realizado en un modelo de co-cultivo de células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) y plaquetas humanas demostró que existe un aumento de la expresión de moléculas de adhesión como PECAM-1, VECAM-1 y PAC (factor activador de plaquetas), lo que demuestra que estos microorganismos tienen la capacidad de inducir la activación y posterior activación plaquetaria [7] sin embargo se requiere continuar con estudios que permitan elucidar los posibles mecanismos de asociación entre estos periodontopatógenos y la agregación plaquetaria.

Por otra parte, aunque se ha demostrado en seres humanos que los procedimientos de tratamiento clínico periodontal pueden reducir la carga bacteriana a nivel sistémico, no se ha evidenciado si esto conlleva a reducir los procesos de activación plaquetaria y tampoco existe estudios que demuestre que los tratamientos convencionales puedan ser usados para minimizar los efectos de estos microorganismos en la agregación plaquetaria, por lo que surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que puedan ser utilizadas en el tratamiento de la agregación plaquetaria asociada a la enfermedad periodontal.

Los polifenoles son un grupo de compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en las naturales y ha sido estudiados por sus efectos antioxidantes, antiagregantes plaquetarios y cardioprotectores [8] estudios previos realizados en el Instituto UIBO demostraron que el ácido cafeico y el ácido clorogénico tienen la capacidad de inhibir el efecto agregante plaquetario inducido por el LPS y bacteria completa de *P. gingivalis* mediante el agonista ácido araquidónico (datos no publicados), potente inductor de la agregación plaquetaria asociado a la expresión de CO₂, por lo cual el interés de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto del compuesto ácido cafeico sobre la agregación plaquetaria inducida por *P. gingivalis* cepa W83 mediante la expresión de COX2.

ASPECTOS GENERALES

Descripción del proyecto

El proyecto de pasantía se basó en el aprendizaje teórico práctico sobre la asociación existente que hay entre las enfermedades periodontales como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, principalmente cómo actúa en el proceso de activación y agregación plaquetaria responsable del proceso inicial aterosclerótico mediante la expresión de la ciclooxigenasa (COX2), una de las principales vías inductoras de agregación plaquetaria.

Adicionalmente se evaluó el efecto del compuesto ácido cafeico sobre la viabilidad plaquetaria y efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por *P. gingivalis* mediante la expresión de COX2.

Localización y duración del proyecto

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto UIBO de la Universidad EL Bosque sede Bogotá-Cundinamarca, durante el periodo comprendido entre octubre del 2021- hasta mayo del 2022 para un total de 6 meses de pasantía.

DESARROLLO DE LA PASANTÍA

Durante el periodo de ejecución de la pasantía fue necesario desarrollar diferentes actividades que fomentaran el conocimiento y aprendizaje experimental que me permitieran participar de forma activa en la investigación en desarrollo, por este motivo se realizaron las siguientes actividades:

1. **Revisión bibliográfica:**

Se realizó una búsqueda en las bases de datos de ProQuest, Scielo, MedicPlus, Scientist, y Elseiver donde se seleccionaron 35 artículos relevantes para la investigación, de tal manera que se plantearon las bases del marco teórico y del desarrollo de la pasantía. La importancia de este paso fue tal que permitió desarrollar las horas prácticas de manera continua y clara.

2. **Fase Experimental:**

Durante esta fase que correspondió a los meses comprendidos entre enero y abril del presente año, se realizó el aprendizaje experimental de cada una de las técnicas y se desarrolló cada uno de los ensayos con el fin de poder cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo de investigación. A continuación, se realiza una breve descripción de los ensayos propuestos:

- **Técnica de viabilidad plaquetaria:**

En esta etapa se realizó la determinación de la viabilidad celular utilizando la técnica de calceína AM (kit calceína AM-7AAD, Thermo Fisher®) que permite la cuantificación mediante fluorescencia y de manera cualitativa y descriptiva mediante la técnica LIVE/DEAD™ (kit Thermo Fisher®) mediante microscopia de inmunofluorescencia.

- **Estandarización Western Blot:**

Para la estandarización se realizaron unas actividades específicas; Preparación de la muestra, electroforesis, transferencia a una membrana, inmunotinción y detección de las bandas

Durante la preparación de la muestra, la estructura química permite romper las membranas celulares y solubilizar las proteínas, vale la pena aclarar que, con la ruptura celular, se liberan enzimas que pueden degradar la proteína de interés [9].

El paso final de la preparación de la muestra es la reducción y la desnaturalización, lo cual se realiza mediante la adición de un tampón que contiene un agente reductor, así como detergente y el calentamiento de la muestra.

En la electroforesis se produce un cambio en las cargas de los electrodos por medio de las placas transductoras, esto permite la separación de la proteína, la cual a través del proceso de transferencia es removida a una membrana con mayor duración [9].

En esta fase el objetivo de la estandarización era poder identificar en cada uno de los pasos realizados en la técnica de western blot, la cantidad de muestra (proteína plaquetaria), tiempos y voltajes en el corrido electroforético, tiempo y voltajes necesarios para la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, concentraciones y tiempos de incubación de los anticuerpos primarios y secundarios para la identificación de la proteína COX2.

- **Ensayo de western blot para determinar el efecto del ácido cafeico en la expresión de COX2**

En esta fase del estudio se realizó el proceso de estimulación de las plaquetas con diferentes concentraciones de MOI de *P. gingivalis* durante 30 minutos, posteriormente se expusieron a diferentes concentraciones del ácido cafeico durante un periodo de 1h, y se realizó el ensayo de western blot teniendo presente el protocolo estandarizado previamente para la determinación de COX2 mediante esta técnica, con el fin de poder determinar el efecto que puede tener el ácido cafeico sobre la expresión de esta molécula estimulada por *P. gingivalis*.

3. Apoyo en otros proyectos de investigación:

Adicionalmente en el proceso de la pasantía tuve la oportunidad de apoyar en otros trabajos de investigación relacionados con el efecto de *P. gingivalis* en otras enfermedades sistémicas como la enfermedad de Alzheimer, en esta fase realicé estudios experimentales en donde evaluamos el efecto de este periodontopatógeno sobre la viabilidad de células de microvasculatura de cerebro de ratón mediante la técnica de resazurina.

- **Técnica de resazurina:**

El método colorimétrico de resazurina, permite cuantificar la viabilidad celular, basándose en la alta correlación que existe entre la cantidad de resazurina metabolizada a resofurina y el número de células vivas y/o metabólicamente activas, que se puede observar de manera colorimétrica con un cambio de color de azul a violeta y cuantificar mediante absorbancia o fluorescencia.

MARCO TEORICO

1. Morfología plaquetaria:

Las plaquetas son células anucleadas, poseen la forma de disco biconvexo, con un diámetro aproximado de 3 μm , de la masa plaquetaria total, cerca de 2/3 circulan en la sangre [3]. Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia, interviniendo en el mecanismo fisiológico de la cascada de coagulación, en condiciones normales, las plaquetas circulantes no se adhieren a la superficie endotelial, ni entre ellas, debido al equilibrio existente entre los mecanismos pro- y antitrombóticos [2]. Las plaquetas tienen un tiempo de vida media en circulación de 7 a 10 días.

2. Estructura de las plaquetas:

Los principales orgánulos de la plaqueta son la membrana plasmática, el citoesqueleto, el sistema canalicular abierto, el sistema tubular denso y los gránulos. Sin embargo, están presentes otros, incluyendo mitocondrias y gránulos de glucógeno [2] (figura 1). A continuación, se realiza una breve descripción:

Membrana externa: Conocida también como zona periférica. Es una membrana trilaminar formada por dos hojas densas separadas por un espacio constante. Al igual que otras membranas biológicas está compuesta por proteínas y lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol [10]

Citoesqueleto: Es la zona sol-gel que se encuentra debajo de la membrana celular. Es un gel viscoelástico que contiene filamentos de actina entrecruzados, conectados a la GPIb por proteínas enlazantes de actina. Tiene como funciones: formar el sostén de la plaqueta, así como del sistema contráctil que, tras la activación, permite cambio de forma, prolongación pseudológica, contracción interna y liberación de constituyentes granulares [10]

Citoplasma: Llamada también zona de organelas. Como en otras células contiene mitocondrias, ribosomas, depósitos de glucógeno, etc. Además, aparecen orgánulos característicos de las plaquetas como los gránulos α y los gránulos densos, también lisosomas y peroxisomas [11]

- Gránulos α : Son organelos esféricos que constituyen el 15% de volumen total de las células. Los gránulos alfa contienen proteínas adhesivas como fibrinógeno, fibrinectina, factor von Willebrand (FVW), trombospondina y vitronectina. Los gránulos alfa también contienen sustancias que fomentan el crecimiento, como factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor plaquetario 4 y factor transformador de crecimiento [11]
- Gránulos Densos: Se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confieren el elevado contenido en calcio (50 % del total, en una concentración 2 mol/L) y fósforo inorgánico. Sus componentes principales son nucleótidos de adenosina (ATP, ADP, AMP), que constituyen un almacén metabólico inactivo y forman complejos de alto peso molecular con cationes divalentes, principalmente con el calcio [11]

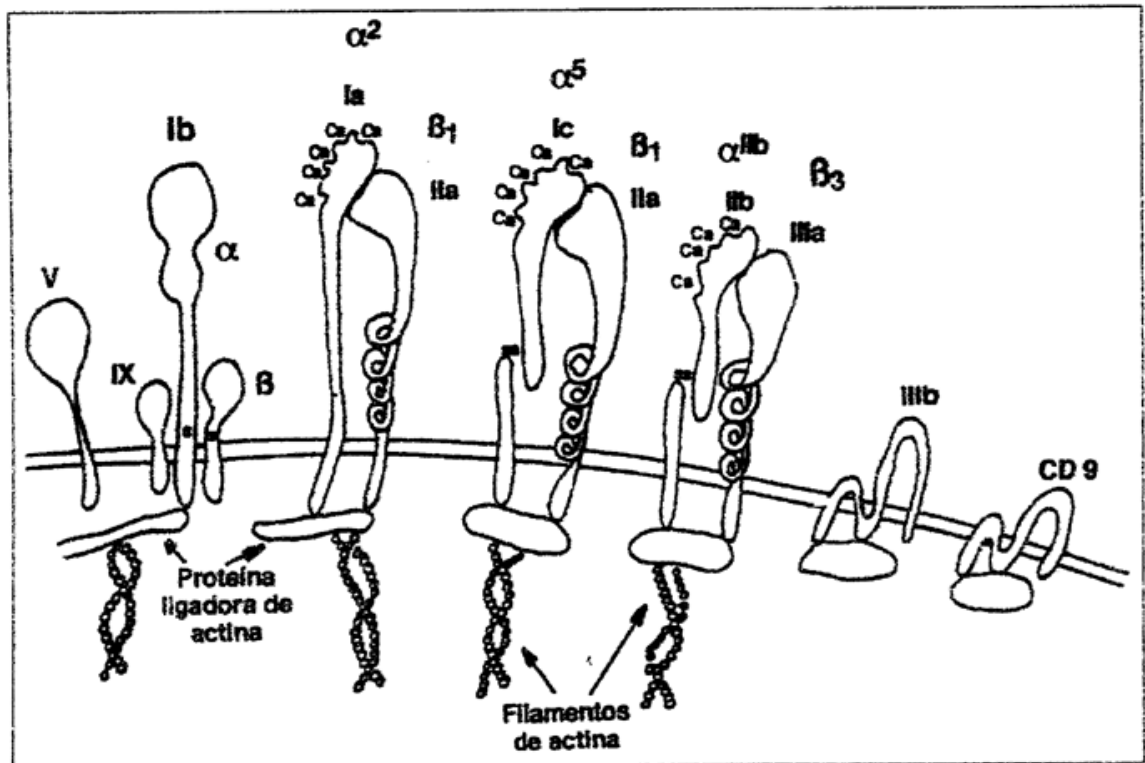


Figura 1. Esquema de la estructura de las principales y receptores de la membrana plaquetaria. [12]

3. Fisiología plaquetaria:

Su actividad fisiológica principal es de participación en las reacciones hemostáticas, las plaquetas intervienen en procesos fisiológicos o patológicos, como la inflamación, la cicatrización de heridas, la trombosis, la aterosclerosis o metástasis tumorales [13].

La respuesta fisiológica puede, en condiciones patológicas, llevar a la formación de trombos en los cuales las plaquetas, junto a la formación de fibrina, podrán ocluir un vaso. Ejemplo de este tipo de patologías son las enfermedades tromboembólicas, principal causa de morbilidad y mortalidad de los países desarrollados [14]. Así, el conocimiento de la fisiología y patología plaquetaria constituye un área fundamental de la investigación de la hemostasia.

4. Rutas metabólicas de la agregación plaquetaria:

El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas:

- Frenado de las plaquetas circulantes sobre la pared vascular contra la corriente del flujo sanguíneo que las empuja
- Activación y adhesión firme de la plaqueta a la pared del vaso

- Unión de más plaquetas a las ya adheridas, que sería la fase de crecimiento del trombo.
- Estabilización del trombo

Ahora bien, en cada fase actúa una serie de mecanismos:

La GPIIb α actúa en la fase inicial de frenado de las plaquetas sobre la pared vascular. La GPIIb α se expresa de forma constitutiva en la superficie de la plaqueta e inicia el proceso de adhesión plaquetario uniéndose al colágeno y al factor Von Willebrand (FvW). El FvW estará embebido en las fibras de colágeno, particularmente del colágeno de tipos I, III y VI. En los vasos con alto estrés de rozamiento, como ocurre en las arterias, el FvW es esencial para reducir el flujo rápido de las plaquetas mediante la interacción del dominio A1 del FvW con GPIIb α [15].

La GPIIb α es también el receptor más conocido de la proteína Mac-1, localizada en la superficie de los leucocitos activados. Mediante la interacción entre GPIIb α y Mac-1 ocurre la unión entre plaqueta y leucocito, importante en la respuesta inflamatoria mediada por las plaquetas[15].

La interacción transitoria entre el FvW y la GPIIb α permite el flujo de las plaquetas en la zona dañada del vaso. Como resultado, las proteínas contenidas en la pared vascular, fundamentalmente el colágeno, inducirán la activación de las plaquetas y su adhesión firme a la pared, de tal manera que el colágeno y el FvW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del trombo, en el que el FvW contribuye a la captura inicial de las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que se establezca una unión más estable con las plaquetas. En el proceso de interacción entre plaqueta y colágeno participan dos receptores plaquetarios, la GPVI y la integrina α 2 β 1[16].

La activación de las plaquetas mediada por GPVI permite una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación. Además, a la unión de las plaquetas al colágeno sigue la expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria [16]. La fosfatidilserina proporciona actividad protrombinasa, que aumenta la formación de trombina. Las plaquetas adheridas permanecerán vivas durante horas o días en el sitio de la lesión vascular y liberarán micro vesículas con actividad proinflamatoria y protrombótica, de las cuales se habla más adelante.

Después de la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere el reclutamiento de nuevas plaquetas desde la circulación, en un proceso conocido como agregación plaquetaria [17]. Esto es posible por la acumulación local de agonistas de la activación de las plaquetas debida a su secreción desde las plaquetas ya adheridas a la pared del vaso. Entre estos agonistas se incluyen el ADP, el TxA₂, la epinefrina y la trombina. La etapa final es la activación de los receptores α IIb β 3, que posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, lo que permite el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas [18]. En el proceso de estabilización participan también otras moléculas, quizá una de las de mayor interés sea el ligando de CD40 (CD40L).

El CD40L es una GP almacenada en los gránulos plaquetarios que, tras la desgranulación plaquetaria, pasa a expresarse en la superficie de la plaqueta. Desde allí puede liberarse desde la plaqueta al plasma mediante la actividad de la metaloproteasa-2. Tanto el CD40L unido a la plaqueta como el CD40L soluble interaccionan con el CD40, expresado en los linfocitos B, los neutrófilos, los monocitos, otras plaquetas, las células endoteliales, las células dendríticas, los fibroblastos y las células de músculo liso vascular, entre otras. No se conoce bien el papel de esta interacción CD40L-CD40, pero sí se sabe que la interacción del CD40L de la plaqueta con el CD40 de las células endoteliales estimula la expresión y la liberación de moléculas asociadas al proceso inflamatorio. Además, la interacción del CD40L expresado en las plaquetas con las células endoteliales de origen coronario reduce la capacidad de estas de liberar óxido nítrico (NO) y aumenta el estrés oxidativo [5].

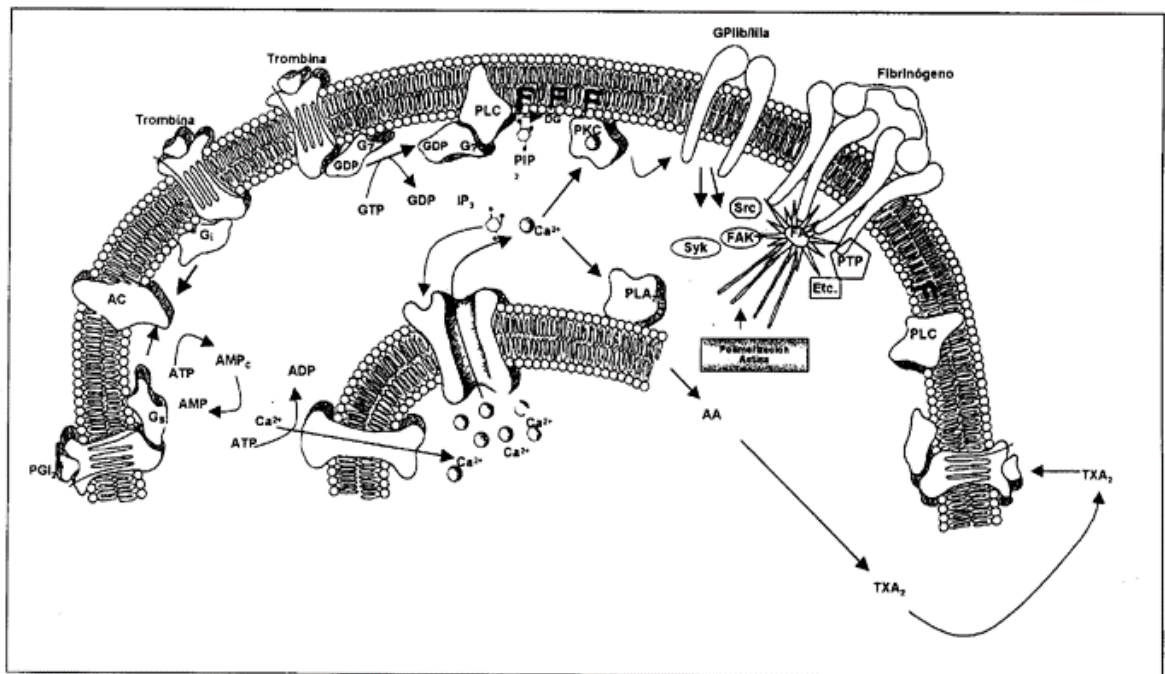


Figura 2 Transducción de la señal durante la activación plaquetaria [15]

5. Hemostasia primaria:

La hemostasia primaria es el proceso inicial de la coagulación y tiene como objetivo crear un tapón plaquetario en respuesta a daño al endotelio vascular. La hemostasia primaria consiste en tres fases: adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria.

Cuando se rompe la integridad endotelial, se exponen fibras de colágeno, factor de von Willebrand y otras proteínas de la matriz subendotelial, y es la interacción de las plaquetas con estas sustancias lo que proporciona la superficie para la adhesión plaquetaria y sirve como un fuerte estímulo para la activación de las plaquetas.

En condiciones de gran fricción por flujo sanguíneo (arterias y capilares), esta interacción consiste en manera primordial en la unión de la GP Ib al factor de von Willebrand, que se adhiere al colágeno subendotelial [19]. Esta señalización produce cuatro cambios mayores en las plaquetas:

- I. Se produce un arreglo del citoesqueleto de actina que causa aplanamiento de las plaquetas y extensión de pseudópodos para sellar el defecto endotelial.
- II. La activación de la fosfolipasa A2 libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y se convierte en prostaglandinas y tromboxano A2, aumentando la vasoconstricción e induciendo taponamiento local.
- III. Los gránulos intracelulares se unen con el sistema canalicular abierto de la membrana y liberan su contenido en el plasma circundante.
Los gránulos densos liberan ADP y serotonina, que interactúan con los receptores celulares de superficie de otras plaquetas, amplificando la activación y estimulando la agregación.
- IV. La activación plaquetaria incrementa la concentración de GP IIb/IIIa en la membrana e induce cambios en su conformación, lo que permite su unión a fibrinógeno soluble y agregación de las plaquetas.

6. Agregación plaquetaria y aterosclerosis

La agregación plaquetaria se regula de manera primaria por la unión de GP IIb/IIIa a fibrinógeno y en menor medida a factor de von Willebrand y fibronectina, estas moléculas, se convierten en un puente de unión entre varias plaquetas a la vez. Esta unión plaqueta-fibrinógeno-plaqueta activa el proceso de agregación del coágulo de plaquetas. Una vez formado el coágulo plaquetario, debe estabilizarse mediante el desarrollo de una red circundante de fibrina, que es formada por los factores de coagulación, que se activan simultáneamente con las plaquetas [19].

Las plaquetas y los factores de coagulación se activan de manera simultánea para regular la cascada de coagulación, asimismo las plaquetas contienen en sus gránulos alfa factores de coagulación y calcio en los gránulos densos [19]. El proceso de agregación plaquetaria se desarrolla en dos secuencias: en primer lugar, mediante la adhesión de las plaquetas a la superficie vascular lesionada (subendotelio); y, posteriormente, mediante la activación plaquetaria, cuyo resultado final consiste en la formación de un entramado de plaquetas y cadenas de fibrinógeno que forman el trombo.

Por su parte, la activación de las plaquetas comprende:

- La formación y liberación de sustancias vasoactivas o agonistas plaquetarios (tromboxano A2, adenosina difosfato, trombina, epinefrina, serotonina, y colágeno) que favorecen el proceso de agregación induciendo a su vez la activación de otras plaquetas mediante una reacción en cascada.
- La activación de receptores de proteínas en la membrana plaquetaria, entre los que se encuentra el responsable de la fijación de las plaquetas a la zona lesionada (factor de Von Willebrand) y el más importante, el receptor

glucoproteína IIb/IIIa que reconoce y fija las cadenas de fibrinógeno, formando la trama final del tapón hemostático.

Fisiológicamente, todo este proceso puede ser a su vez inhibido por otras sustancias, principalmente prostaciclina y óxido nítrico, que aumentan las concentraciones de AMP-cíclico en las plaquetas y en la pared vascular mediante una estimulación de la adenilciclase (prostaciclina) o bien, aumentan las concentraciones de GMP-cíclico por estímulo de la guanilciclase (óxido nítrico) [20].

7. Arteriosclerosis:

Ahora hablaremos de arteriosclerosis es una afección frecuente que aparece cuando una sustancia pegajosa llamada placa se acumula en el interior de las arterias. Las enfermedades relacionadas con la aterosclerosis son la principal causa de muerte en los Estados Unidos. Alrededor de la mitad de los estadounidenses de 45 a 84 años tienen aterosclerosis y no lo saben [21]. La aterosclerosis se desarrolla lentamente, a medida que el colesterol, la grasa, las células sanguíneas y otras sustancias de la sangre forman placa. Cuando la placa se acumula, provoca un estrechamiento de las arterias. Eso reduce el suministro de sangre con alto contenido de oxígeno a los tejidos de los órganos vitales del cuerpo.

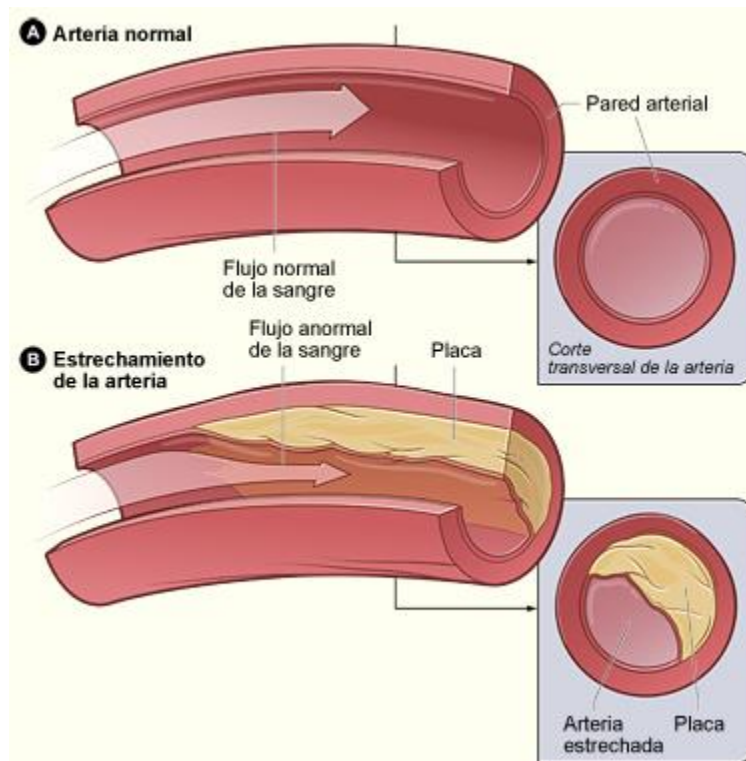


Figura 3.A) Arteria normal y B) Arteria con acumulación de placa [7]

8. Enfermedad periodontal y arteriosclerosis:

La gingivitis consiste en el enrojecimiento e hinchazón de la encía; cuando esta no es tratada puede evolucionar a una periodontitis, la cual implica la destrucción de tejido, siendo una enfermedad grave para la boca. Las encías retroceden y las raíces de los dientes quedan expuestas produciendo sensibilidad al frío y al calor. Además, la periodontitis afecta la estética y producirá la pérdida de anclaje a los dientes con su consiguiente caída [22]. La enfermedad periodontal es una enfermedad de origen infeccioso que afecta el periodonto, lo que constituye todo el tejido de sostén de los dientes; su causa es multifactorial [23].

El sistema inmune del cuerpo lucha contra las toxinas bacterianas; la infección empieza destruir el hueso y el tejido conjuntivo que mantienen en la posición adecuada a los dientes. Cuando la periodontitis no se trata debidamente, los huesos, las encías y los tejidos que sostienen los dientes se destruyen y luego de un tiempo, los dientes pueden aflojarse y desaparecer.

Para el año 2011 en Chile Nestor J Et al [24] hicieron un estudio donde cincuenta y tres sujetos recibieron tratamiento periodontal y mantenimiento regular para al menos 10 años, y se estudiaron 55 sujetos con periodontitis pero sin antecedentes de tratamiento periodontal, los resultados del estudio concuerdan con otros que han demostrado asociación entre periodontitis y aterosclerosis subclínica, enfatizando la importancia del diagnóstico precoz y tratamiento de periodontitis, especialmente en personas con riesgo cardiovascular. Es decir que se encuentra una asociación directa en este tipo de pacientes, donde prevalece que pacientes sin tratamiento periodontal presenten hasta 3 veces mayor riesgo de presentar aterosclerosis.

9. Patógenos periodontales y efectos proagregantes

Los patógenos periodontales son las bacterias anaerobias, entre las cuales figura: *Porphyromonas gingivalis*; fuertemente asociada a los diferentes tipos de periodontitis [25]. Existen diversos factores de periodontopatogenicidad que permiten la acción de este microorganismo a nivel del periodonto, los cuales se mencionan a continuación:

- Elementos estructurales:
 - Adhesinas: contribuyen a la adhesión, agregación y congregación
 - Endotoxinas: activan la vía alterna del complemento y los macrófagos
 - Cápsulas y proteínas superficiales fijadoras de inmunoglobulinas (Ig) con efecto antiopsónico y de bloqueo de fagocitosis.
 - Coagulasa lisa: crea una cubierta de fibrina alrededor de las bacterias y las protege de la acción fagocítica.
- Exotoxinas
- Exoenzimas
- Metabolitos
- Compuestos de acción inmunoreguladora

Factores de virulencia:

- La cápsula: compuesta por polisacáridos, enmascara las bacterias de los fagocitos, razón por la cual es un factor antifagocitario.
- Las fimbrias: compuestas por la proteína llamada pilina, la cual le permite a la bacteria adherirse fuertemente a las superficies que más la favorecen, bien sea por nutrientes o por falta de defensa orgánica.

Es necesario aclarar que no todos los serotipos son patógenos se pueden encontrar cepas avirulentas de *Porphyromona gingivalis*.

Los mecanismos antes expuestos son los que permiten a su vez, que estos microorganismos estén asociados a diferentes infecciones del organismo que, por infección metastásica, les permiten llegar a sitios distantes, debido a diferentes maniobras odontológicas que facilitan su diseminación [26].

Los lipopolisacáridos liberados por todos estos patógenos pueden facilitar la formación de una placa de ateroma, a través de los siguientes mecanismos.

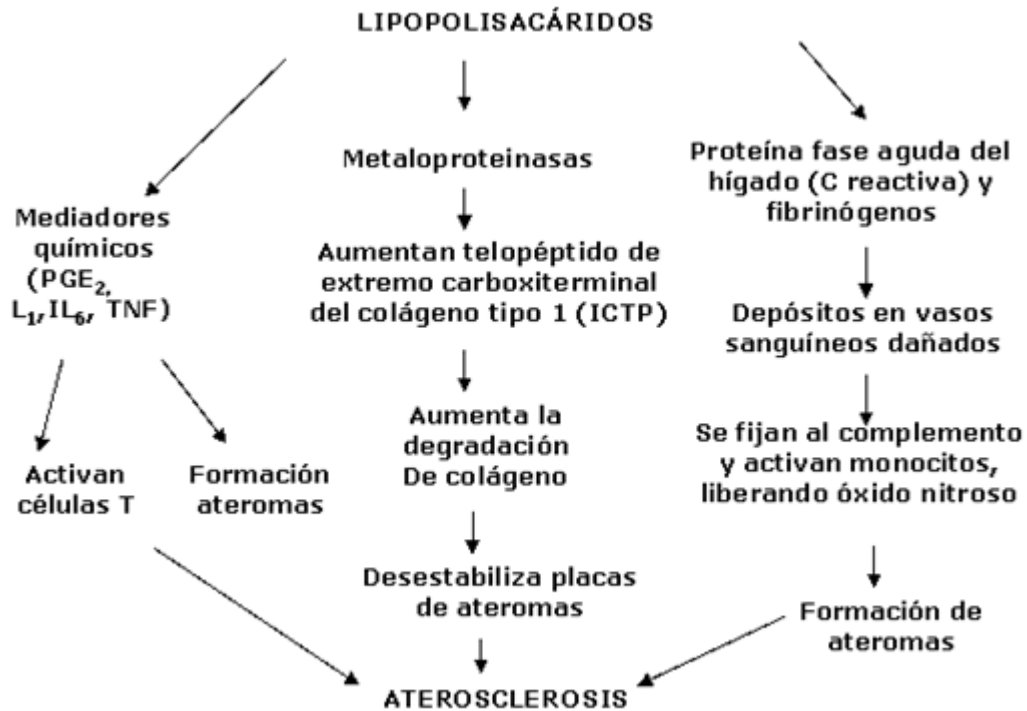


Figura 4. Mecanismos de periodontopatógenos para aterosclerosis [1]

10. Polifenoles y efectos antiagregantes:

Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad [27]. Los polifenoles son, en realidad, los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides [28]. Algunos alimentos sabemos que destacan por su alto contenido

en polifenoles, entre ellos el té, el vino y el cacao (ácido cafeico). Los polifenoles contenidos en estos alimentos son altamente efectivos como defensa antioxidante.

Una de las propiedades beneficiosas más estudiadas de los polifenoles es su capacidad para mejorar el perfil lipídico [28]. De este modo, pueden prevenir el desarrollo y aparición de aterosclerosis. Los efectos beneficiosos de los polifenoles son capaces de atenuar el inicio y la progresión de esta enfermedad debido a su habilidad para atenuar la oxidación de las LDL. Son capaces además de producir un incremento en la concentración de colesterol HDL en el plasma, y también de inhibir la proliferación del músculo liso vascular.

11. Western Blot:

Western blot es una técnica de laboratorio utilizada para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido. El método implica el uso de electroforesis en gel poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio y luego transferidos a papel de nitrocelulosa, para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana [29].

La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio. La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador radiactivo o químico. La especificidad del Western Blot se logra mediante el uso de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente la unión antígeno-anticuerpo se detecta mediante la adición de un anticuerpo que reconoce la fracción constante de la inmunoglobulina humana, la cual está acoplada a una enzima. La unión se revela con la adición de un sustrato-cromogénico soluble el cual se precipita en el sitio en donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo evidenciándose en forma de bandas coloreadas.

No obstante, la prueba de ELISA se sigue empleando como técnica de tamizaje, pero requiere confirmación por Western Blot en caso el resultado sea reactivo; paso adicional que demanda mayor tiempo y costo [29].

- **Técnica**

En forma general para realizar la técnica Western Blot se deben llevar a cabo los siguientes pasos, los cuales se explicarán con mayor detalle:

- Preparación de la muestra
- Electroforesis
- Transferencia a una membrana
- Inmunotinción
- Detección de las bandas

- **Preparación de la muestra:**

El método elegido para la preparación dependerá del tipo de muestra de partida, de la localización subcelular de la proteína y de las condiciones óptimas que requiera el anticuerpo para reconocer el epítipo proteico.

En los procesos de lisis química, se suelen utilizar detergentes. La estructura química de estos permite romper las membranas celulares y solubilizar las proteínas, la elección del detergente, depende en parte de la localización de la proteína de interés dentro de la célula: citoplasmática, unida a la membrana, dentro de orgánulos celulares. etc.

Con la ruptura celular, se liberan enzimas que pueden degradar la proteína de interés. Por tanto, es importante evitar, durante la preparación de la muestra, cualquier actividad de degradación. Para evitar este problema, todo el proceso se realiza en frío (+4°C) con la adición de inhibidores de proteasas al tampón, para inhibir dichas enzimas que pueden afectar su muestra [30].

El paso final de la preparación de la muestra es la reducción y la desnaturalización, con la finalidad de que las proteínas se puedan separar en la electroforesis. Esto se hace mediante la adición de un tampón que contiene un agente reductor, así como detergente y el calentamiento de la muestra.

El tampón de muestra contiene dos agentes: dodecilsulfato de sodio (SDS) y beta-mercaptoetanol o ditioneitol (DTT). El SDS es un agente desnaturalizante que ayuda a descomponer la proteína en su estructura de aminoácidos, y también recubre la proteína. El beta-mercaptoetanol y el DTT son agentes reductores que rompen sus enlaces sulfuro, y también descomponen la proteína en una estructura lineal de aminoácidos primarios[30].

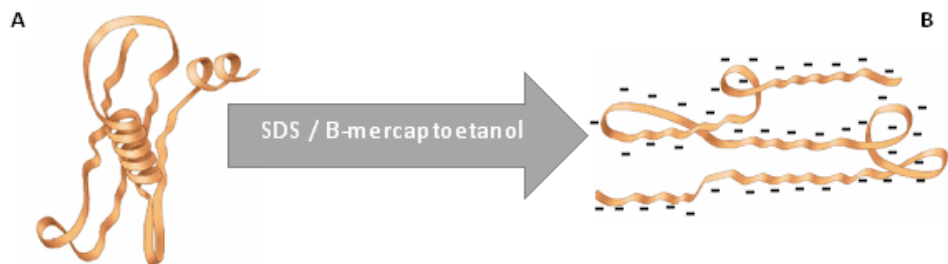


Figura 5. Aminoácidos primarios [30]

- **Electroforesis:**

El tipo de electroforesis más comúnmente usado en Western Blot es el abreviado SDS-PAGE. SDS es el agente desnaturalizante que se agrega al tampón durante este procedimiento en gel de poliacrilamida. Los geles están hechos de acrilamida

polimerizada y reticulados por Bis en presencia de persulfato de amonio y TEMED [31]. La estructura del gel puede controlarse alterando el porcentaje de acrilamida. Básicamente, al aumentar el porcentaje total de acrilamida, los poros de la matriz del gel se vuelven más estrechos y viceversa.

Bajo las condiciones desnaturalizantes y de reducción, las proteínas cargadas negativamente, cuando se someten a un campo eléctrico, migran al electrodo positivo. La tasa de migración viene determinada por su peso molecular., es decir, las moléculas más pequeñas migran más rápidamente que aquellas con pesos moleculares mayores. Las muestras se cargan en los pocillos del gel mediante una pipeta. Normalmente se cargan de 20 a 40 μg de proteína total por carril. Es importante evitar sobrecargas que pueden dar lugar a la pérdida de muestra o derrames en pocillos adyacentes. Una vez finalizada la carga, el gel se somete a un campo eléctrico generado por una fuente de alimentación. El tampón utilizado durante la electroforesis contiene Tris (mantiene el pH), Glicina (conductor electricidad) y SDS (mantiene las proteínas cargadas negativamente) [31].

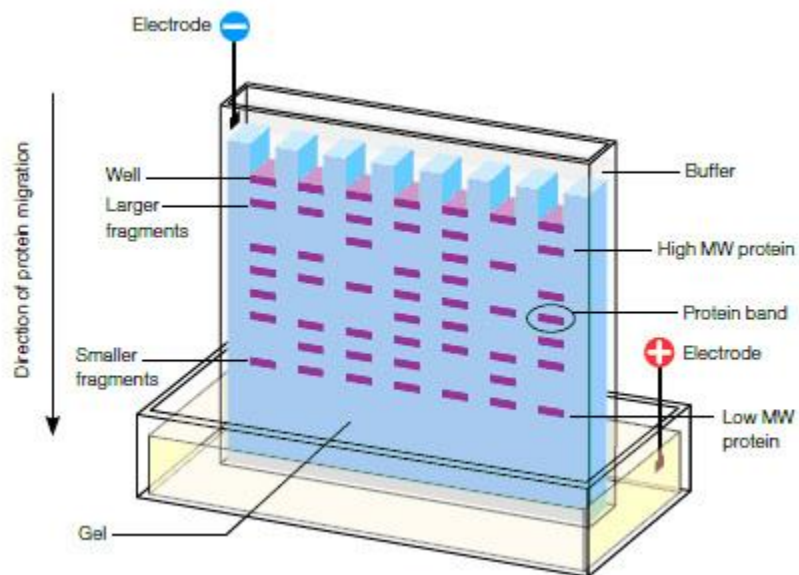


Figura 6. Montaje para realizar electroforesis en condiciones desnaturalizantes [31]

Los tipos de estándares y controles utilizados incluyen [32]:

- **Marcadores de peso molecular:** Son una mezcla de proteínas purificadas de peso molecular conocido, que se utilizan para verificar si la proteína de interés está dentro del rango de tamaño apropiado.
- **Controles positivos:** Al verificar si el anticuerpo primario se une a la proteína correcta, se carga una muestra de la proteína de interés purificada.

- **Controles negativos:** En este tipo de control el anticuerpo primario no debe reaccionar ni emitir señal ya que las muestras no contienen la proteína de interés.
- **Control de carga:** se usa a menudo durante la transferencia Western y es un anticuerpo que se usa además del anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés. El control de carga apunta a una proteína común que las muestras deben contener en aproximadamente la misma proporción. De modo que suponiendo que la misma cantidad de proteína de cada muestra se cargó correctamente en el gel durante la electroforesis, debería haber bandas de tamaño similar del objetivo de control de carga. Si hubo un error durante la carga, la banda de control mostrará este error.

- **Transferencia:**

El siguiente paso después de la electroforesis en gel es la transferencia de proteínas a otra superficie. Por lo tanto, se realiza la transferencia de la proteína a una membrana más duradera para la posterior inmunotinción. La membrana es un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así la detección de un anticuerpo.

El principio de la transferencia es similar a la electroforesis, ya que se “transfiere” del gel las proteínas cargadas negativamente hacia un polo positivo dentro de un campo eléctrico. Para esto el gel se coloca adyacente a una membrana porosa, y este sándwich de membrana y gel se agrega a un casete de transferencia con la membrana más cercana al polo positivo [32].

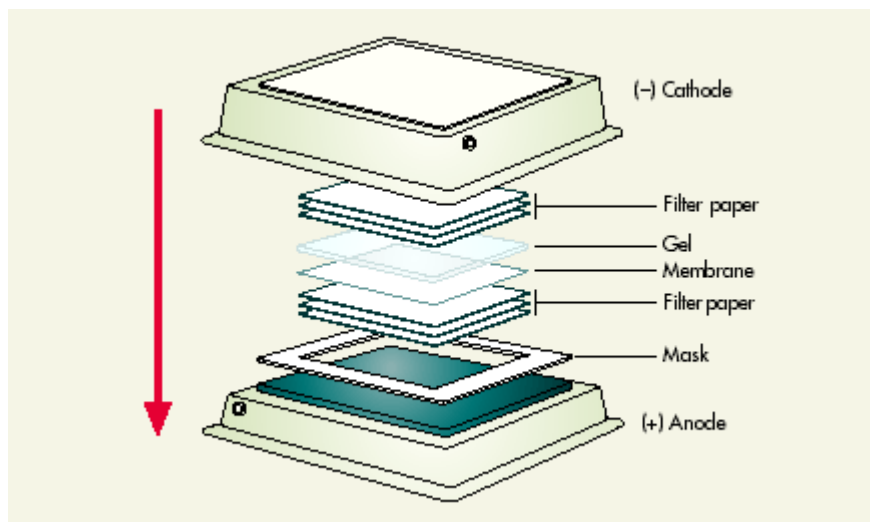


Figura 7. Montaje de transferencia a membrana [32]

- **Inmunotinción:**

Se podría usar una tinción de proteínas como Coomassie en un gel o Ponceau en la membrana, pero son tinciones no específicas y mostrarán todas las proteínas de la muestra.

El primer paso en el procedimiento de inmunotinción es bloquear el espacio vacío en la membrana con una proteína neutral. Esto es importante porque la membrana es una superficie adherente para todas las proteínas, por lo que un anticuerpo libre podría unirse no específicamente a la membrana expuesta [33] Las proteínas en la leche o

el BSA se unen a la membrana para cubrir los espacios libres, para que el anticuerpo no se adhiera a estas áreas más adelante. La membrana debe colocarse en un agitador durante 1 hora, o durante la noche a 4 ° C.

Después del proceso de bloqueo, la membrana se incuba con el anticuerpo primario, se pueden utilizar tanto monoclonales como policlonales.

Una vez que el anticuerpo se ha unido, la membrana debe lavarse para eliminar cualquier anticuerpo residual. Entre 3-5 lavados con TBST es suficiente durante aproximadamente 10 minutos cada lavado [34].

Después de retirar el anticuerpo primario, la membrana se tratará con el anticuerpo secundario que se conjuga con una molécula que se puede visualizar fácilmente durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario será específico para el anticuerpo primario, por lo que se une solo a este y, por lo tanto, se detecta a la proteína de interés.

Nuevamente, se debe lavar la membrana a fondo para eliminar el anticuerpo secundario residual. 3-5 veces con TBST durante unos 10 minutos es suficiente. Una vez que se lava la membrana, está lista para detectar la proteína a través de la molécula conjugada con el anticuerpo secundario.

- **Detección**

La detección de la proteína se puede hacer mediante métodos directos o indirectos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Los métodos directos utilizan un anticuerpo primario conjugado con un marcaje detectable, como una enzima, biotina o molécula fluorescente [35]. Los métodos indirectos utilizan dos anticuerpos; un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario contra la especie del primer anticuerpo. En la detección indirecta, es el anticuerpo secundario el que está conjugado con un marcaje detectable.

Hay tres tipos de detección:

- **Quimioluminiscencia:** Utilizan anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP). La reacción entre el enzima cataliza una reacción con un sustrato para producir una señal luminiscente que se captura en la película o captada de forma digital utilizando una cámara CCD. [36]
- **Fluorescencia:** El anticuerpo secundario se une a un fluoróforo, que cuando es excitado emite luz. La luz emitida, se detecta mediante un dispositivo capaz de medir la fluorescencia o mediante una cámara CCD provista con los filtros de longitud de onda apropiada. La imagen se digitaliza para su análisis.
- **Colorimetría:** Utilizan un anticuerpo secundario que ha sido conjugado previamente a un enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina). La reacción de la enzima con el sustrato produce un producto insoluble que es visible en la membrana. [36]La cantidad de colorante convertido es proporcional a la cantidad en la muestra. La intensidad de la tinción puede ser medida por espectrofotometría o por un densitómetro.

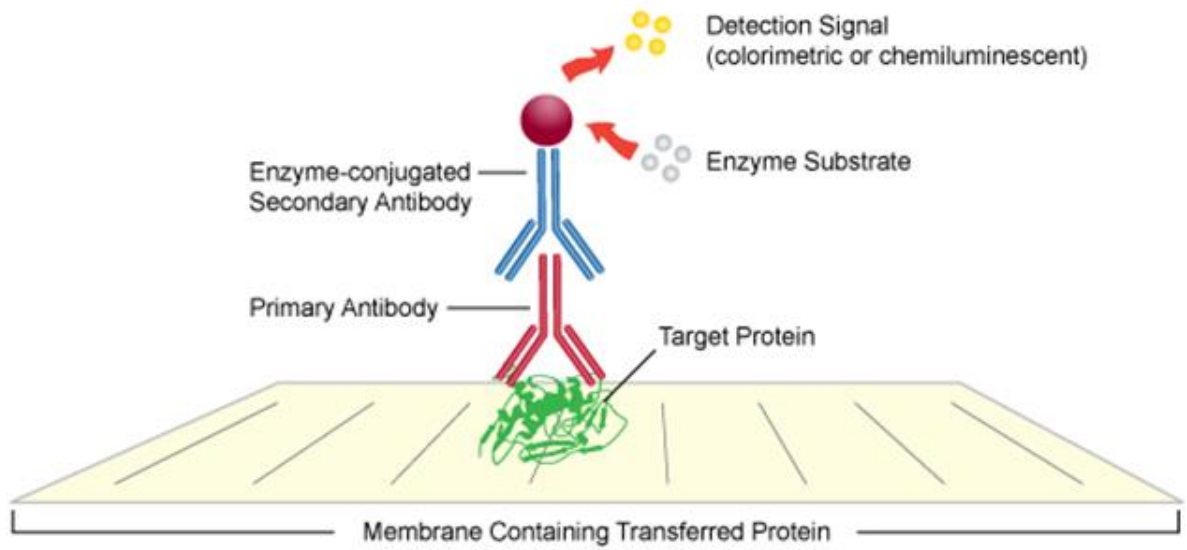


Figura 8. Esquema de detección de bandas por métodos colorimétricos, fluorimétricos o luminiscentes[36]

MARCO METODOLOGICO

Con el fin de dar cumplimiento con cada uno de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación se realizó la siguiente metodología.

1. Preparación del inóculo bacteriano de *P. gingivalis* W83.

La cepa de *P. gingivalis* ATCC W83, fue descongelada del cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del Instituto UIBO y conservada en caldo BHI (Brain Heart Infusion) con 10% de glicerol a -80°C se incubó a 37°C durante 4 días en condiciones anaeróbicas (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). Pasado el tiempo de incubación se verificó la pureza de los cultivos y posteriormente se ajustaron pre-inóculos bacterianos de *P. gingivalis* W83 en caldo BHI y se cuantificaron por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm ya estandarizados a una densidad óptica (DO) de 0.970 – 0.97. 100 μL de la suspensión previamente ajustada (pre-inóculo), fue utilizada para hacer diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución -8. Se realizó el recuento del número de bacterias por mL de bacteria.

2. Obtención y preparación de la suspensión de plaquetas humanas.

Se utilizó Plasma rico en plaquetas (PRP) obtenidos mediante el convenio interinstitucional con la Fundación Hematológica Colombia y la Universidad El Bosque.

Se realizó el siguiente protocolo ya estandarizado en el Instituto UIBO para la obtención de la suspensión de plaquetas: A Partir de 50 mL de plasma rico en plaquetas se llevó a 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 volverá a depositar sobre un nuevo tampón de lavado y se realizará una nueva centrifugación a 1200 rpm, durante 18 minutos, posteriormente el precipitado de plaquetas se suspendió en el tampón de resuspensión plaquetario (pH: 7,4). La suspensión de plaquetas lavadas se ajustó a una concentración de 2×10^8 células/ μL , simulando así las condiciones fisiológicas de las plaquetas. A continuación, se adicionó CaCl_2 (2mM) a la suspensión y se mantuvo en reposo durante 45 minutos, tiempo suficiente para que las plaquetas captarán calcio del medio y quede fisiológicamente activas.

3. Estimulación plaquetaria con la bacteria completa de *P. gingivalis* y exposición al ácido cafeico.

Después del proceso de activación de la suspensión plaquetaria, se realizó el proceso de estimulación con el inóculo bacteriano de *P. gingivalis* cepa W83, a la suspensión plaquetaria (500 μl , 2×10^8 células), se le adicionó la bacteria completa a las siguientes concentraciones de MOI:100 por mL, y se dejó incubar a 37°C durante un periodo de 30

minutos, posteriormente se adicionó el compuesto ácido cafeico a las siguientes concentraciones (50, 25 y 5 $\mu\text{M}/\text{mL}$), y se dejó incubar bajo las mismas condiciones descritas previamente pero durante 1h. Se utilizó como control de agregación plaquetaria trombina (2.000 UI).

4. Evaluación de la viabilidad celular mediante el método de Calceína AM:

- Después del proceso de estimulación y exposición de las plaquetas, se realizó la determinación de la viabilidad celular mediante la técnica de fluorescencia de Calceína que permite detectar la integridad y permeabilidad de la membrana celular y a su vez la viabilidad de las plaquetas.

A la suspensión de plaquetas se le realizó una centrifugación durante 5 min a 1500 rpm, posteriormente se lavaron con la solución de lavado y centrifugó nuevamente con el fin de retirar los residuos de bacteria, luego se adicionó la solución de Calceína 2,5 μM preparada en PBS, se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Se leyó la placa en un lector de fluorescencia TECAN InfiniteR 200 PRO, utilizando los filtros de excitación y emisión de 494/517 nm respectivamente. Se evaluó la fluorescencia de las células vivas en cada una de las condiciones experimentales y se determinó el porcentaje de viabilidad, se utilizó como control positivo de viabilidad celular; células sin estimular y como control de muerte; Triton-X 1%. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado.

- Para evaluar la viabilidad celular de manera descriptiva se utilizó el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD™ (ThermoFisher Scientific, USA. A la suspensión plaquetaria se le realizó el mismo procedimiento de lavado y centrifugación, descrito anteriormente; se preparó el kit LIVE/DEAD™, teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante y se le adicionó a cada tubo 100 μL de la solución de trabajo, se incubó durante 20 minutos a oscuridad a temperatura ambiente, se colocó 5 μL de la suspensión entre lamina y laminilla y se observó mediante microscopía de inmunofluorescencia (20X) utilizando filtros de excitación/emisión fluorescencia verde (488 nm/515nm) y filtros de excitación/emisión fluorescencia roja (570nm/602nm). Se realizaron dos experimentos independientes por duplicado.

5. Estandarización de la técnica de Western blot para identificación de COX2.

Con el fin de poder determinar el protocolo y ajustar las condiciones de tiempos, voltajes y concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios, se realizó el siguiente procedimiento:

Después del obtener el pellet plaquetario, pasado el tiempo de estimulación, se adicionó 200 μL de buffer RIPA (1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS en PBS 1X) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (SIGMA Aldrich); para obtener el lisado y

obtener las proteínas celulares de manera mecánica se dejó en agitación a temperatura ambiente durante un tiempo de 15 minutos. Los lisados obtenidos se almacenaron a -20°C y se cuantificaron posteriormente con el método de ácido bicinónico.

- **SDS-PAGE y transferencia:** Con los lisados celulares obtenidos se adición buffer Laemmli 6X, se realizó electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida; gel de concentración (acrilamida-bisacrilamida 4%, Tris-HCl 0,025M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,025% y TEMED 0,025%) y un gel de separación (acrilamidabisacrilamida 12%, Tris-HCl 0,025M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,025% y TEMED 0,025%). Para estimar el tamaño aproximado de las proteínas de la muestra, se utilizó un marcador de peso molecular preteñido (Espectra Prestained Protein Ladder de Thermo), compuesto por una mezcla de diez (10) proteínas entre 10 a 170kDa. La separación de las proteínas se realizó con las siguientes condiciones de corrido electroforético: 40 minutos a 80 V el gel de concentración y 1 h 30 min a 100V en el equipo Mini protean II (Bio Rad).

Con el fin de inactivar las proteínas inespecíficas presentes en las muestras lisadas, la membrana se incubó en la solución de bloqueo correspondiente para cada anticuerpo primario por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana en el anticuerpo primario, en el buffer de bloqueo indicado a continuación: (Sigma A-5316) dilución 1:2000 en buffer de bloqueo con albúmina sérica bovina 1% (Sigma Aldrich) y Tween 20 0,1% en TBS 1X pH 8.0. COX2 (Diagnostic Biosystems) en buffer de bloqueo con albúmina 4%, Tween 20 0,1% en TBS 1X pH 8.0. Todos los anticuerpos primarios se incubaron over night a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TBS- Tween 20 0,1% durante 10 minutos. Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse biotinilado acoplado a peroxidasa (Vector labs), a una dilución de 1:500 por 1 h a temperatura ambiente en el mismo buffer de bloqueo empleado para el anticuerpo primario. Para la determinación de las bandas de cada proteína presente en la muestra, se realizó el revelado por quimioluminiscencia con el sustrato Super Signal West Pico Chemiluminescent (Thermo 34077) y se identificó la señal y analizó usando el fotodocumentador Biorad®. Los datos de cada proteína fueron normalizados con los datos de β -actina del carril correspondiente. Adicionalmente se determinó la intensidad de la banda de la proteína para cada condición.

6. Determinación del efecto del ácido cafeico sobre la expresión de COX2 en la suspensión de plaquetas estimuladas con *P. gingivalis*

Después de realizado el proceso de estandarización se realizó un ensayo con las especificaciones y protocolo obtenido con el fin de determinar si podía ser utilizado y si podíamos determinar el efecto del ácido cafeico sobre la expresión de COX2.

RESULTADOS

1. Efecto del ácido cafeico sobre la viabilidad plaquetaria estimuladas con bacteria completa de *P. gingivalis*.

Los resultados obtenidos de manera cualitativa nos permitieron demostrar que ni la bacteria completa de *P. gingivalis* a MOI:100 (97.8%), ni el ácido cafeico a las concentraciones evaluada: 50 μ L (99 %), 25 μ L (99%), 5 μ L (102%), no producen un efecto citotóxico en la suspensión plaquetaria en comparación al grupo control (plaquetas sin estimula; 101%), mientras que el Tritón-X al 1% produjo la muerte de 98.7% de las plaquetas ($p < 0.05$) (Figura 9). Con respecto a la trombina tampoco indujo muerte de las plaquetas (96.5%).

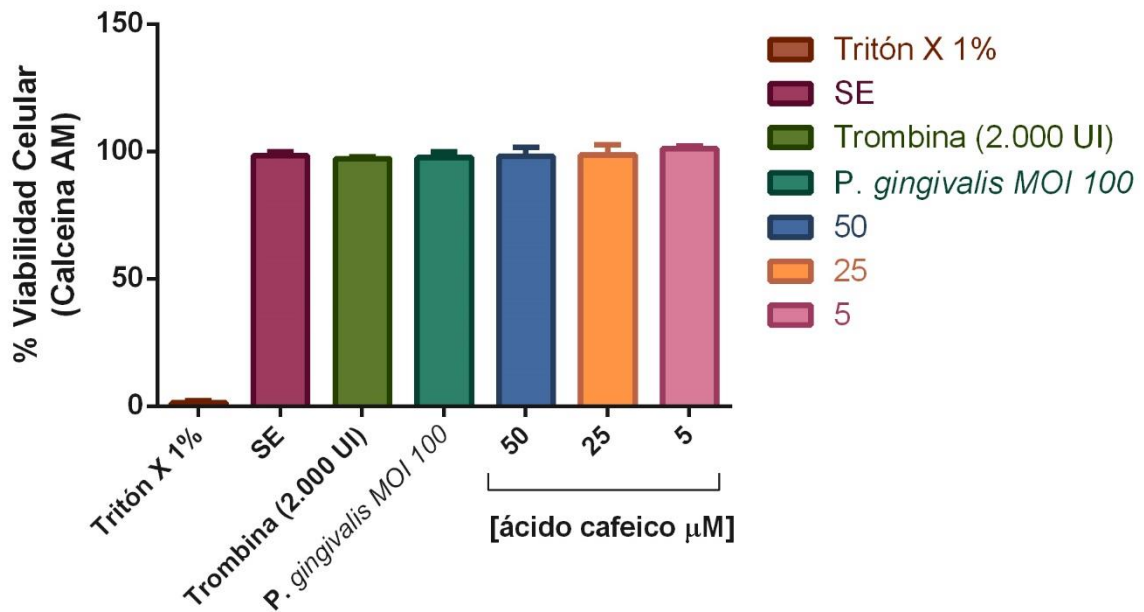


Figura 9. Viabilidad de suspensión plaquetaria infectada con *P. gingivalis* W83 y expuestas al compuesto ácido cafeico (50, 25, 5 μ M) mediante el método de Calceina AM. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control (células sin estimular)

Así mismo se pudo demostrar mediante microscopia de inmunofluorescencia que se correlacionó los datos cuantitativos obtenidos mediante la técnica de Calceina AM, en donde la figura 9, muestra que las plaquetas vivas se observan de color verde, mientras las muertas de color rojo. En las imágenes se puede observar de manera indirecta como se agregan las plaquetas (acúmulos plaquetarios) estimuladas con *P. gingivalis* MOI 100, el control de agregación (Trombina), mientras que las plaquetas sin estimular (control negativo) y las diferentes concentraciones de ácido cafeico no se

presenta este acumulo plaquetario, lo que de manera descriptiva podemos mencionar que este compuesto tiene la capacidad de inhibir el efecto de *P. gingivalis* sobre la agregación plaquetaria, datos similares a los realizados previamente en UIBO (resultados en proceso de publicación).

2. Protocolo de estandarización del ensayo de western blot para la identificación de COX2 mediante western blot.

A continuación, se describe el protocolo que se obtuvo como resultado del proceso de estandarización, después de modificar los tiempos, voltajes y concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios, así como la cantidad de proteína a cargar por cada muestra plaquetaria,

Este ensayo se realizó utilizando plaquetas estimuladas con el agonista ácido araquidónico (20 mM) y plaquetas sin estimular con el fin de demostrar la inducción y no inducción de COX2, como control de la técnica se utilizó β -actina (proteína presente tanto en células como en plaquetas).

Protocolo:

La suspensión de plaquetas fue estimulada por 30 minutos a temperatura de 37°C con ácido araquidónico (20 mM) o sin estimular, posteriormente se adicionó buffer RIPA (200 μ L+ 1X de inhibidor de proteasas) se dejó en agitación durante 15 minutos para obtener el lisado de proteínas.

Se realizó cuantificación de las proteínas utilizando en método de ácido bicinonónico, ya estandarizado en el laboratorio y teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante.

• SDS-PAGE y transferencia:

La cantidad de lisado después de la cuantificación se determinó que en cada pozo se debe colocar 20 μ g/mL en buffer Laemmli 6X.

Se preparó los geles de poliacrilamida descritos en el manual de Biorad ©, en donde el gel de concentración fue de 4% y el gel de separación de 12%. La separación de las proteínas se determinó con las siguientes condiciones de corrido electroforético: 40 minutos a 80 Volt, en el gel de concentración y 1 h 40 min a 100 Volt, en el gel de separación, se utilizó el equipo Mini protean II (BIO Rad). Se utilizó marcador de peso molecular preteñido (Espectra Prestained Protein Ladder de Thermo), como control de peso de proteínas entre 10 a 170kDa.

Para el proceso de transferencia se realizó los siguientes pasos (Figura 10):

Se realiza el montaje de transferencia en donde se coloca el gel frente a la membrana, se colocan en buffer de transferencia durante 10 minutos y posteriormente se realiza la transferencia en el equipo de transferencia en seco (Thermo Scientific), las siguientes son las condiciones de transferencia: 50 minutos, 80 Volt, posteriormente se obtiene la membrana se incubó durante 1 h con buffer de bloqueo + suero fetal bovino 10% para inactivar las proteínas inespecíficas.

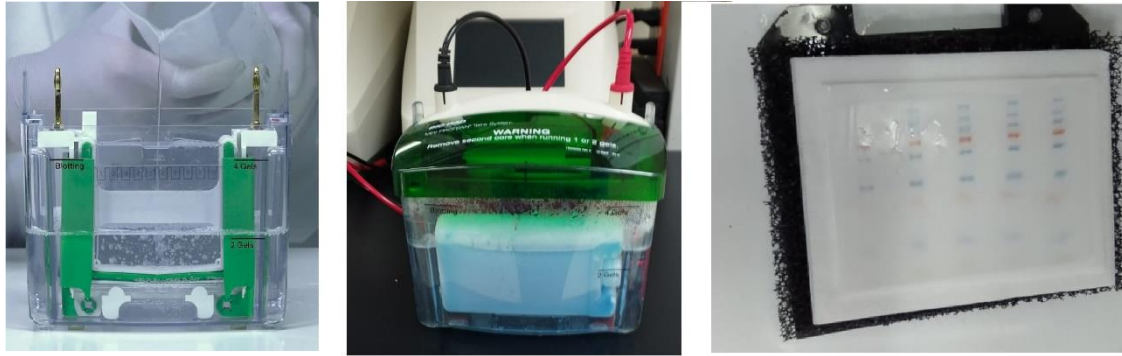


Figura 10. Estandarización de la técnica de western blot para la identificación de la expresión de COX2 en plaquetas humanas.

- **Western blot:**

La membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti-Cox2) en el buffer de bloqueo en una dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween 20 0,1%, posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-mouse biotinilado acoplado a peroxidasa (Vector labs), a una dilución de 1:100 por 1 h a temperatura ambiente en el mismo buffer de bloqueo empleado para el anticuerpo primario.

Para la detección de las bandas se realizó el revelado por quimioluminiscencia con el sustrato Super Signal West Pico Chemiluminescent (Thermo 34077), colocando una dilución 1:1 del revelado en TBS-Tween 20 0,1%, y analizó usando el fotodocumentador Biorad® (Figura 11).

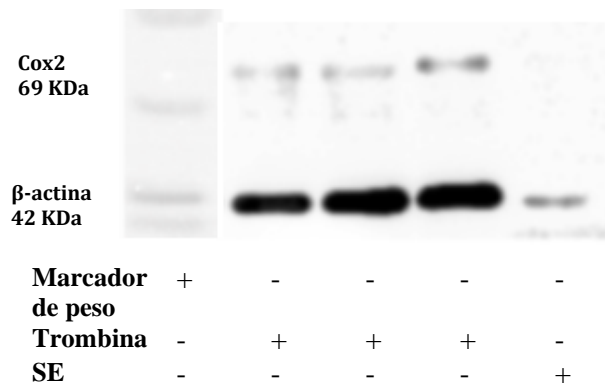


Figura 11. Estandarización de la expresión de COX2 en plaquetas humanas estimuladas con ácido araquidónico (20 mM) durante 30 minutos, mediante la técnica de western blot. Se utilizó 20/μL de proteína celular por cada carril, se utilizó como control negativo plaquetas sin estimular.

3. Determinación del efecto del ácido cafeico sobre la expresión de COX2 en plaquetas estimuladas con *P. gingivalis*.

Para identificar el efecto del ácido cafeico a las concentraciones evaluadas (50, 25 y 5 μM) se realizó el protocolo estandarizado y descrito anteriormente, nuestros resultados nos permitieron demostrar que el protocolo puede ser utilizado en nuestro laboratorio con el fin de determinar la expresión de la proteína COX2, así mismos pudimos determinar que *P. gingivalis* a MOI 100 tiene la capacidad de inducir la expresión de COX2 en plaquetas humanas y que el ácido cafeico puede inhibir la expresión a las concentraciones evaluadas (Figura 12), sin embargo se requiere realizar dos experimentos independientes para poder corroborar estos resultados y realizar el análisis y cuantificación de cada banda.



Figura 12. Efecto del ácido cafeico a las concentraciones evaluadas

Trombina	+	-	-	-	-	-
<i>P. gingivalis</i>	-	+	+	+	+	+
SE	-	-	+	-	-	-
50 μM	-	-	-	+	-	-
25 μM	-	-	-	-	+	-
5 μM	-	-	-	-	-	+

CONCLUSIONES

1. Se determinó que tanto la bacteria completa de *P. gingivalis* MOI 100, como el ácido cafeico a las concentraciones 50, 25 y 5 μM no producen efectos citotóxicos, ni daño sobre la permeabilidad e integridad de la membrana plaquetaria.
2. Se estandarizó el protocolo para la determinación de la expresión proteica de COX2 mediante la técnica de western blot, la cual puede ser utilizada en el Instituto UIBO, siendo un gran aporte realizado durante el desarrollo de esta pasantía.
3. La bacteria *P. gingivalis* a MOI 100 induce la expresión de COX2, la cual es inhibida por el ácido cafeico a las concentraciones de 50, 25 y 5 μM , sin embargo, requiere realizarse más experimentos para corroborar estos resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Peña Sisto Maritza, Peña Sisto Liliana, Díaz Felizola Ángela, Torres Keiruz Deysi, Lao Salas Niurka. La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2008 Mar [citado 2022 Mayo 19] ; 45(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0034-75072008000100006&lng=es.
2. Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A.. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr. Hosp. [Internet]. 2012 Feb [citado 2022 Mayo 20] ; 27(1): 76-89. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009&lng=es.
3. Rodríguez Méndez Mariela, Echemendía Tocabens Belkis. La prevención en salud: posibilidad y realidad. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2011 Abr [citado 2022 Mayo 19] ; 49(1): 135-150. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1561-30032011000100015&lng=es
4. Alonso 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 2022 Mayo 20] ; 20(3): 173-181. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852008000300005&lng=es.
5. Mitris Papapanagiotou, Elena A. Nicu, Sergio Bizzarro, Victor E.A. Gerdes, Joost C. Meijers, Rienk Nieuwland, Ubele van der Velden, Bruno G. Loos, Periodontitis is associated with platelet activation, Atherosclerosis, Volume 202, Issue 2. 2009, Pages 605-611.
6. Medina Castiblanco PA, Reina Rodríguez LSA. EVALUACIÓN in vitro DEL EFECTO ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO DE LOS POLIFENOLES: ÁCIDO CAFEICO Y ÁCIDO CLOROGÉNICO SOBRE PLAQUETAS HUMANAS ESTIMULADAS CON BACTERIA COMPLETA Y LIPOPOLISACÁRIDO DE Porphyromona gingivalis. [Bogotá]: Universidad El Bosque; 2018.
7. Diana D, Buitrago M, Codirector R, Gloria D, Lafaurie I. Efecto de Porphyromonas gingivalis en la Activación y Adhesión de Plaquetas Humanas en Co-cultivo con Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana [Internet]. [Bogotá]: Universidad El Bosque; 2018 [citado el 15 de mayo de 2022]. Disponible en: [https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2202/D%C3%A1z Real Mar%C3%ADa Alejandra 2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2202/D%C3%A1z%20Real%20Mar%C3%ADa%20Alejandra%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

8. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp* [Internet]. 2012
9. Allscience. Introducción a Western Blot [Internet]. Allscience. [cited 2021 Dec 16]. Available from: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot>
10. **Sharathkumar** AA, Shapiro AD. (2008). Trastornos de la función plaquetaria. *Tratamiento de la Hemofilia*; 2 edición.; (19):1-5.
11. **Moroi** M, Jung SM. (2004). Platelet glycoprotein VI: its structure and function. Review. *Thrombosis Research.*; 114:221-233
12. Monteiro M.C., O'Connor J.E., Martínez M.. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. *Rev Diagn Biol* [Internet]. 2001 Sep [citado 2022 Mayo 19] ; 50(3): 111-136. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000300002&lng=es.
13. González-Villalva Adriana, Peña-Díaz Aurora de la, Rojas-Lemus Marcela, López-Valdez Nelly, Ustarroz-Cano Martha, García-Peláez Isabel et al . Fisiología de la hemostasia y su alteración por la coagulopatía en COVID-19. *Rev. Fac. Med. (Méx.)* [revista en la Internet]. 2020 Oct [citado 2022 Mayo 19] ; 63(5): 45-57. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0026-17422020000500045&lng=es Epub 05-Mar-2021. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.5.08>
14. Gómez-Gómez Brenda, Rodríguez-Weber Federico Leopoldo, Díaz-Greene Enrique Juan. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Med. Interna Méx.* [revista en la Internet]. 2018 Abr [citado 2022 Mayo 20] ; 34(2): 244-263. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0186-48662018000200007&lng=es <https://doi.org/10.24245/mim.v34i2.1908>
15. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 19];13:2–7. Available from: <https://www.revespcardiol.org/es-plaqueta-fisiologia-activacion-inhibicion-articulo-S1131358713700736>
16. Alvarado Arteaga IM. Fisiología de la coagulación: nuevos conceptos aplicados al cuidado perioperatorio. *Univ. Med.* [Internet]. 29 de mayo de 2013 [citado 19 de mayo de 2022];54(3):338-52. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/16238>
17. Bermejo E. Plaquetas Platelets. *Hematología* [Internet]. 2017;21:10–8. Recuperado a partir de: <https://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol%2021-extra.pdf>
18. Fernández-Delgado Norma, Hernández-Ramírez Porfirio, Forrellat-Barríos Mariela. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2012 Sep [citado 2022 Mayo 19] ; 28(3): 200-216. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0864-02892012000300002&lng=es

19. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. Rev Esp Cardiol [Internet]. 2009 [citado el 19 de mayo de 2022];62(10):1161–78. Disponible en: <https://www.revespcardiol.org/es-lipoproteinas-plaquetas-aterotrombosis-articulo-13141803>
20. Villaverde Grote, Carlos A , Escolar Albaladejo, Ginés Tesisenred.net. [citado el 19 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/2307#page=1>
21. Talavera YA, Martín Hernández I, Portilla CV. Activación Plaquetaria: Aspectos básicos, participación en la Enfermedad Cerebrovascular y Proyecciones Terapéuticas [Internet]. Revecuatneurol.com. [citado el 19 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://revecuatneurol.com/wp-content/uploads/2015/06/Activacion-Plaquetaria.pdf>
22. Ardila Medina C.M., Lafaurie Villamil G.I. Asociación entre porphyromona gingivalis y proteína C reactiva en enfermedades sistémicas inflamatorias. Avances en Periodoncia [Internet]. 2010 Abr [citado 2022 Mayo 20] ; 22(1): 45-53. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852010000100006&lng=es
23. Santos PB do RE dos, Lima PMN de, Palma AL do R, Hasna AA, Rossoni RD, Junqueira JC, Oliveira LD de. Review- The periodontal pathogen Treponema denticola: an atherosclerosis risk factor. RSD [Internet]. 2021Jan.13 [cited 2022May20];10(1):e25810111637. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11637>
24. López Néstor J, Chamorro Adriana, Llancaqueo Marcelo. Aterosclerosis en sujetos con periodontitis. Rev. méd. Chile [Internet]. 2011 Jun [citado 2022 Mayo 20] ; 139(6): 717-724. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011000600004&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000600004>.
25. Troncoso M, Lk D, Ia F. Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica Co-detection of Periodontal Pathogens in Chilean Patients with Chronic Periodontitis [Internet]. Conicyt.cl. [citado el 19 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v3n3/art03.pdf>
26. Bascones A, Caballeros A. Actinobacillus Actinomycetemcomitans y Porphyromonas Gingivales como principales patógenos periodontales. Avances en Periodoncia [Internet]. 2000 Sep [citado 2022 Mayo 20] ; 12(2): 69-75. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852000000200002&lng=es.
27. Adela-Emilia Gómez Ayala, Doctora en Farmacia, El paciente en tratamiento con antiagregantes plaquetarios, páginas 36-42 (diciembre 2007) disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-el-paciente-tratamiento-con-antiagregantes-13114221#:~:text=Los%20antiagregantes%20plaquetarios%20son%20un,interior%20de%20los%20vasos%20sangu%C3%adneos>

28. Herrera, C, Arcos, J Relación entre la enfermedad periodontal (EP) y la enfermedad cardiovascular (ECV) : una revisión de tema. [Internet]. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República ; 2015-09-30. [citado: 2022, mayo]
29. Diéguez Castro R. Rosario, Muñoz Trujillo Yanin, Castiñeira Díaz Mirta. La técnica de Western Blot como criterio de identidad para la vacuna antimeningocócica Men B. Rev Cubana Farm [Internet]. 2009 Nov [citado 2021 Dic 15] ; 43(3). Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S00347515200900030004&lng=es
30. Escalante Hermes, Jara César, Davelois Kelly, Iglesias Miguel, Benites Adderly, Espinoza Renzo. Estandarización de la técnica de western blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de Trypanosoma cruzi. Rev. Perú. Med. Exp. Salud publica [Internet]. 2014 Oct [citado 2021 Dic 15] ; 31(4): 644-651. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S17264634201400400005&lng=es.
31. Davelois Kelly, Escalante Hermes, Jara César. Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. Rev. Perú. Med. Exp. Salud publica [Internet]. 2016 Oct [citado 2021 Dic 15] ; 33(4): 616-624. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S17264634201600400003&lng=es
32. Western Blot [Internet]. Genome.gov. [cited 2021 Dec 16]. Available from:
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot>
33. Davelois Kelly, Escalante Hermes, Jara César. Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. Rev. Perú. Med. Exp. Salud publica [Internet]. 2016 Oct [citado 2021 Dic 15] ; 33(4): 616-624. Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S17264634201600400003&lng=es. [Http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2016.334.2543](http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2016.334.2543)
34. CRUZ SUI OTTO, PÉREZ GUEVARA MARÍA TERESA, IZQUIERDO MÁRQUEZ MARICELA, LOBAINA BATELEMY LEONOR, RUIBAL BRUNET IGNACIO, SILVA CABRERA ELADIO. Evaluación de un sistema de Western Blot (DAVIH-BLOT) para la confirmación de anticuerpos al VIH-1. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 1997 Abr [citado 2021 Dic 15] ; 49(1): 28-31. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S03750760199700010005&lng=es.
35. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am jmed Sci. 2012 Sep;4(9):429-34. Doi: 10.4103/1947-2714.100998. PMID: 23050259; PMCID: PMC3456489.
36. Gavini K, Parameshwaran K. Western Blot. [Updated 2021 Apr 28]. In: statpearls [Internet]. Treasure Island (FL): statpearls Publishing; 2021 Jan-. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>

37. Hirano S. Western blot analysis. *Methods Mol Biol.* 2012;926:87-97. Doi: 10.1007/978-1-62703-002-1_6. PMID: 22975958.
38. Barragán JM, Hernández JL, Riancho JA, Sánchez D, Suárez C. Protocolos de tratamiento antiagregante. *Guías clínicas.* 2004. (Consultado el 26 de febrero de 2007). Disponible en: http://www.fesemi.org/grupos/riesgo_c/publicaciones/protocolos_tratamiento_antiagregante.pdf
39. Premoli Gloria, Villarreal A Juana, González B Anajulia. Proteína c reactiva y su relación con la enfermedad periodontal y aterosclerosis. *Acta odontol. venez [Internet].* 2008 Mar [citado 2022 Mayo 20] ; 46(1): 92-93. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652008000100021&lng=es.
40. Castro Lara J, Ibero Sagastibelza I, Bascones Martínez A. ¿Es la enfermedad periodontal un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares? (II): Modelo biológico. *Avances en Periodoncia [Internet].* 2001 Dic [citado 2022 Mayo 20] ; 13(3): 33-44. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852001000300005&lng=es

