

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Optimización de un cultivo celular tridimensional para evaluar
la respuesta inducida por *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans* en células endoteliales**

MARÍA ALEJANDRA TORRES AMAYA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2020

**Optimización de un cultivo celular tridimensional para evaluar
la respuesta inducida por *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans* en células endoteliales**

María Alejandra Torres Amaya

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

Magister en Ciencias- Microbiología

Directora:

Marta Raquel Fontanilla Duque, Q.F., Ph. D.

Codirector:

Diego Fernando Gualtero Escobar, L.Q., D. M. Sc. Ph.D

Línea de Investigación:

Biotecnología en Salud

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos- Universidad Nacional de Colombia

Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)- Universidad El Bosque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias Microbiología

Bogotá, Colombia

2020



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Optimización de un cultivo celular tridimensional para evaluar
la respuesta inducida por *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans* en células endoteliales**

MARÍA ALEJANDRA TORRES AMAYA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia

2020

Dedicado a:

*A mi madre Ana Amaya, y mi hermana Marcela Torres
por su compañía y apoyo incondicional*

*A Josecito que no alcanzó a verme con este
nuevo logro cumplido*

*A mi amorcito Pedro Lizarazo, por su compañía
por darme ánimo cuando eran momentos difíciles de afrontar*

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la profesora Marta Fontanilla, Directora del Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia y directora de la presente tesis, quien me dio la oportunidad de hacer parte de su grupo de investigación, por el acompañamiento y dedicación recibida a lo largo de la maestría.

Al profesor Diego Gualtero, Coordinador de la Línea de Biotecnología-Unidad de Investigación Básica Oral-(UIBO) de la Universidad El Bosque, por codirigir la presente tesis; así como por cada una de sus enseñanzas, consejos y apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de trabajo: Adriana Flórez, Iván Chocontá, Diana Millán, Ronald Jiménez y Marta González, por su tiempo y voluntad al compartirme sus conocimientos, así como su amistad. Y a Carlos Montenegro por su asesoría en el componente estadístico.

Al posgrado Interfacultades de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia por aportar económicamente en este proyecto.

A la Universidad El Bosque, a la Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) y al Laboratorio de Microbiología Oral, por la ayuda económica y la orientación académica recibida por cada uno de sus integrantes.

Resumen

En este trabajo se optimizó cultivo celular tridimensional (3D) de Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) sobre soportes de colágeno tipo I para el estudio de la respuesta celular inducida por la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, como modelo *in vitro* de enfermedad aterosclerótica. Se realizaron pruebas de caracterización fisicoquímica y la estandarización de un procedimiento que permitiera obtener soportes de colágeno tipo I sobre la cara apical completamente adheridos a las paredes internas de Insertos Transwell™; luego sobre estos, se sembraron 5×10^5 HCAEC/inserto (cultivo 3D-HCAEC) con el fin de determinar la formación de monocapa y posteriormente, se infectó con *A. actinomycetemcomitans* a MOI 1:1, 1:10 y 1:100; se utilizaron como controles cultivos sin infección, así como con estimulación con LPS-Aa (1µg/mL), finalmente, se realizó un co-cultivo con monocitos THP-1, con el fin de evaluar procesos inflamatorios -migración y adhesión- al cultivo 3D-HCAEC; se realizaron ensayos por citometría de flujo con el fin de detectar las citocinas proinflamatorias, y la expresión de TGF-β1 mediante ELISA. La serie de experimentos se realizó por triplicado y la significancia para cada grupo fue tomada con $p < 0.05$. Los resultados obtenidos permitieron determinar un cultivo 3D-HCAEC por 7 días, en donde se observó viabilidad y formación de monocapa continua sobre el soporte de colágeno elaborado, además se demostró la función de barrera endotelial. Los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* a los diferentes MOI utilizados indujeron diferencias significativas con respecto al control en la adhesión y migración de monocitos THP-1. De igual manera, se mostró aumentos significativos respecto a los controles en la expresión los factores proinflamatorios: MCP-1, IL-8, IL-6 y TGF-β1. Estos resultados *in vitro* indican el potencial de *A. actinomycetemcomitans* en inducir una respuesta inflamatoria pro-aterosclerótica mediante un mecanismo de adhesión, migración de monocitos y disfunción endotelial.

Palabras clave: (Colágeno tipo I, Células endoteliales, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Disfunción endotelial, Aterosclerosis).

ABSTRACT

Optimization of a three-dimensional cell culture to evaluate the response induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in endothelial cells

The role of periodontopathogens in inflammatory endothelial dysfunction is not known. This study characterizes a three-dimensional model with human coronary artery endothelial cells on three-dimensional (HCAEC-3D) type I collagen scaffolds to evaluate whether infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces a proinflammatory response associated with atherosclerosis. The HCAEC-3D culture was physicochemically characterized with regard to biocompatibility and barrier function. Then, the culture was infected with *A. actinomycetemcomitans* strain ATCC 29522 at multiplicities of infection (MOIs) of 1:1, 1:10, and 1:100. Cultures without infection and stimulated with *A. actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide were used as controls. The secretion of soluble factors (IL-6, IL-1 β , MCP-1, RANTES, MIP-1, IL-8, IL-1 α , and TNF- α) was evaluated via flow cytometry; TGF- β 1 was evaluated via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The adhesion and migration of fluorescent human THP-1 monocytes was evaluated. IL-8, MCP-1, and IL-6 secretion increased in a dose-dependent manner with *A. actinomycetemcomitans* infection and was significantly greater than that under control treatment. The concentration of TGF- β 1 was significantly higher at MOI 1:100 than in controls. Treatment of the 3D cultures with *A. actinomycetemcomitans* at different MOIs induced significant differences in the adhesion of monocytes to the endothelium compared to the control without infection. Lastly, conditioned media from 3D cultures treated with *A. actinomycetemcomitans* induced monocyte migration. The effects of IL-8, MCP-1, IL-6, and TGF- β 1 on the endothelium indicate the ability of *A. actinomycetemcomitans* to induce an inflammatory response through a mechanism of monocyte adhesion and migration and endothelial dysfunction.

Keywords: (Type I collagen, endothelial cells, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, endothelial dysfunction, atherosclerosis).

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1 Enfermedad periodontal (periodontitis).....	16
2.2 Virulencia de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> y su asociación con la aterosclerosis	20
2.3 Endotelio vascular: células y función	22
2.4 Estructura y función del colágeno	25
2.4.1 Colágeno tipo I como biomaterial.....	26
2.5 Modelos de cultivo celular endotelial <i>in vitro</i> en el estudio de patogenicidad.....	27
2.6 Modelos de interacción monocito-célula endotelial.....	30
4. METODOLOGÍA.....	33
4.1 Materiales y equipos.....	33
4.1 Elaboración de los soportes de colágeno tipo I	35
4.2 Caracterización de los soportes de colágeno tipo I	36
4.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	36
4.2.2 Determinación de tamaño de poro de los soportes de colágeno.....	36
4.2.3 Determinación de los porcentajes de porosidad e hinchamiento de los soportes de colágeno	36
4.2.4 Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	37
4.2.5 Evaluación histológica de los soportes de colágeno	37
4.3 Cultivo celular	38
4.3.1 Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC)	38
4.3.2 Línea celular de monocitos humanos THP-1	38
4.3.3 Cultivo tridimensional de células HCAEC (3D-HCAEC)	38
4.4 Cultivo de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	40
4.4.1 Ensayos de infección	41
4.4.2 Ensayo de adhesión de monocitos THP-1	41
4.4.3 Ensayo de migración de monocitos THP-1.....	42
4.4.4 Cuantificación de citocinas proinflamatorias	42
4.4.5 Determinación del Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (TGF-β1). 43	43
4.5 Análisis estadístico	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Elaboración de los soportes de colágeno Tipo I	44
5.1.1 Análisis de los soportes con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	45
5.1.2 Determinación del tamaño de poro	46
5.1.3 Porcentaje de porosidad	47
5.2 Caracterización fisicoquímica de soportes de colágeno tipo I.....	48
5.2.1 Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	48
5.2.2 Porcentaje de hinchamiento	49
5.2.3 Evaluación histológica de los soportes de colágeno tipo I.....	49
5.3 Caracterización del cultivo celular 3D-HCAEC	50
5.3.1 Análisis histológico de los cultivos 3D-HCAEC.	51
5.3.2 Permeabilidad del cultivo 3D-HCAEC	52

5.3.3	Microscopía de fluorescencia del cultivo 3D-HCAEC	52
5.4	Infección de los cultivos 3D-HCAEC con <i>A. actinomycetemcomitans</i> cepa ATCC 29522.....	53
5.4.1	Adhesión de monocitos en cultivos 3D-HCAEC infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i>	55
5.4.2	Migración de monocitos inducida por los sobrenadantes de los cultivos 3D-HCAEC infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i>	56
5.4.3	Cuantificación de citocinas proinflamatorias secretadas en 3D-HCAEC infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i>	57
5.4.4	Cuantificación de TGF- β 1 en los medios de los cultivos 3D-HCAEC infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i>	58
6.	DISCUSIÓN	60
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
7.1	Conclusiones	64
7.2	Recomendaciones	65
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	66

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Papel de las citocinas en la periodontitis crónica	18
Figura 2. Papel regulador de las células endoteliales	21
Figura 3. Representación esquemática de una arteria	21
Figura 4. Ruta biosintética del colágeno fibrilar	23
Figura 5. Esquema del cultivo 3D-HCEAC	37
Figura 6. Apariencia de los soportes de colágeno tipo I (10 mg/g)	42
Figura 7. Observación estereoscópica de los soportes de colágeno tipo I	43
Figura 8. Análisis SEM de los soportes de colágeno tipo I	43
Figura 9. Análisis SEM de los soportes de colágeno tipo I del sistema inserto-soporte	44
Figura 10. Análisis SEM de los soportes de colágeno tipo I	45
Figura 11. Análisis de la porosidad	46
Figura 12. Análisis FTIR	46
Figura 13. Porcentaje de hinchamiento	47
Figura 14. Análisis histológico de los soportes de colágeno tipo I	48
Figura 15. Análisis SEM del cultivo 3D-HCAEC	48
Figura 16. Viabilidad celular con la tinción LIVE/DEAD® en cultivos 3D-HCAEC	49
Figura 17. Análisis histológico de cultivos 3D-HCAEC	49
Figura 18. Ensayo de permeabilidad usando FITC Dextrano	50
Figura 19. Microscopía de fluorescencia de los cultivos 3D HCAEC	51
Figura 20. Viabilidad celular con la tinción LIVE/DEAD en cultivos 3D-HCAEC postinfección	52
Figura 21. Análisis histológico de cultivos 3D-HCAEC postinfección	52
Figura 22. Análisis SEM del cultivo 3D-HCAEC infectado con <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	53
Figura 23. Adhesión de monocitos THP-1 a cultivo 3D-HCAEC infectado con <i>A. actinomycetemcomitans</i> .	54

Figura 24. Evaluación de la migración de monocitos THP-1 en los sobrenadantes de los cultivos 3D-HCAEC infectados con <i>A. actinomycetemcomitans</i>	55
Figura 25. Cuantificación de citocinas	56
Figura 26. Cuantificación de TGF- β 1	57

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Factores de virulencia de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	19
Tabla 2. Ventajas y desventajas de las preparaciones de colágeno tipo I de diversas fuentes	24
Tabla 3. Descripción de las variables para la estandarización de los soportes 3D de colágeno tipo I en insertos Transwell.	33
Tabla 4. Tamaño de poro para las concentraciones de colágeno de 5, 8 y 10 mg/g	45

1. INTRODUCCIÓN

Desde su aparición en la década de los 80, la ingeniería de tejidos ha tenido grandes avances y el mercado de sus productos ha crecido exponencialmente; de hecho, en Estados Unidos las ventas de biomateriales regenerativos hace tiempo superaron los \$240 millones de dólares por año (O'Brien, 2011). El desafío de esta rama del conocimiento es que sus productos promuevan la regeneración de órganos y tejidos dañados o perdidos, como en la naturaleza lo hacen los anfibios de la orden caudata. Por eso, en todo el mundo se evalúan sustitutos de órganos sencillos y tejidos en animales y humanos. Una contribución adicional de la ingeniería de tejidos ha sido el desarrollo de modelos de cultivo tridimensionales (3D) en los que se estudian mecanismos de patogenicidad en un ambiente más parecido al natural (Webber *et al.*, 2015).

En la evaluación *in vitro* de mecanismos de patogenicidad que afectan al endotelio, se emplean cultivos de células endoteliales hechos sobre superficies de poliestireno, material con el que se fabrican los frascos y cajas que se usan en cultivo celular. En estos modelos, denominados 2D porque utilizan células en monocapa, las células endoteliales a través de su membrana basal se exponen a un sustrato cuya estructura y composición química son diferentes a los de la lámina basal que subyace el endotelio de los vasos sanguíneos y linfáticos (Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2018). De ahí, que la respuesta celular sea diferente a la que ocurre *in vivo* (Walters & Stegemann, 2014).

Con el propósito de crecer células en un ambiente más parecido al de los tejidos se han propuesto cultivos 3D de células inmersas en hidrogeles elaborados con proteínas de matriz extracelular (Webber, *et al.*, 2015), cultivos de organoides o esferoides (Torras, *et al.*, 2018) y cultivos organotípicos (Shamir & Ewald, 2014). En los dos primeros modelos las células están rodeadas por la matriz que las incluye, lo cual, puede conducir a respuestas que también son diferentes a las observadas *in vivo* cuando hacen parte de la monocapa endotelial que recubre los vasos. El tercer modelo emplea vasos extraídos de seres vivos cuyo uso está limitado porque los vasos *ex vivo* no son viables por tiempos prolongados (Antoni, *et al.*, 2015). Estos y otros inconvenientes han llevado a que se desarrollen modelos *in vitro* en los que las células endoteliales se cultivan sobre soportes tridimensionales,

principalmente el colágeno I, para que formen una monocapa confluyente sobre el soporte con características estructurales similares a las del tejido de los vasos que subyace al endotelio (Lee *et al.*, 2008; Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2019). Este tipo de cultivo puede ser considerado como un modelo tridimensional (3D), porque la monocapa endotelial que se forma sobre el soporte crea dos compartimentos: el que contiene al medio líquido con que se cubren las células y el constituido por la monocapa de células endoteliales y la estructura tridimensional que ha soportado su formación. Estudios de mecanismos de patogenicidad de microorganismos patógenos o sus productos, así como, de mecanismos de acción y absorción de medicamentos se han llevado a cabo en modelos de esta naturaleza con el propósito de disminuir la experimentación animal (Weber & Hoerstrup, 2014; Panduwawala *et al.*, 2017). Por sus características microestructurales, fisicoquímicas, mecánicas y biológicas estos cultivos proporcionan un ambiente más parecido al que enfrenta el endotelio que recubre los vasos del organismo. Son varios los reportes que indican diferencias entre la respuesta de las células endoteliales cultivadas en modelos 2D y 3D (Webber, & Hoerstrup, 2014; Chan *et al.*, 2016; Torras, *et al.*, 2018; Gualtero, Lafaurie, & Fontanilla, 2019).

La periodontitis es una enfermedad de etiología infecciosa que se caracteriza por la respuesta inflamatoria que conduce a la destrucción de las estructuras que dan soporte al diente, encías, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar; que cuando no es controlada, resulta en la pérdida de la pieza dental (Monzón *et al.*, 2017). Su prevalencia a nivel mundial se estima entre el 30% al 40% en población adulta. El inicio y progresión de esta enfermedad se asocian con la presencia de microorganismos patógenos, los cuales se adhieren e invaden a las células epiteliales con la ayuda de factores de virulencia como lipopolisacáridos (LPS), fimbrias y cápsula (Hajishengallis & Lamont, 2014; El Kholly *et al.*, 2015). La evidencia actual demuestra que la periodontitis es iniciada por la disbiosis de la microbiota oral donde se incluyen algunas especies periodontopatógenas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis* (Murray, *et al.*, 2014; Ng, *et al.*, 2016). La periodontitis se ha relacionado de manera directa con el padecimiento de enfermedades cardiovasculares, debido a que se han encontrado más de 84 taxones bacterianos en los ateromas y paredes vasculares de pacientes con enfermedad cardiovascular y periodontal; mientras que sólo fueron encontrados 18 taxones en las paredes vasculares de pacientes con enfermedad

cardiovascular sin enfermedad periodontal (Socransky, *et al.*, 1998; Haffajee, *et al.*, 2008). Este hallazgo es de gran relevancia clínica y epidemiológica, debido a la elevada prevalencia de la enfermedad periodontal en nuestro país y en el mundo (Monzón *et al.* 2017). Un estudio realizado en Colombia (Ardila Medina, *et al.*, 2010), encontró una prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* del 16.5%.

En un trabajo conjunto del Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia y la Unidad de Investigación Básica Oral de la Universidad El Bosque, se estandarizó un cultivo de células endoteliales aisladas de arteria coronaria humana (HCAEC) sobre soportes tridimensionales de colágeno tipo I, un componente de la membrana basal subendotelial. Se demostró la formación de monocapa endotelial confluyente sobre el soporte y se evaluó la respuesta de la monocapa frente a lipopolisacáridos (LPS) de periodontopatógenos. La comparación de los datos provenientes de este modelo con los obtenidos en el cultivo 2D de las mismas células, demostró diferencias en la respuesta endotelial a los LPS debidas al tipo de cultivo. Una de las limitaciones del modelo desarrollado fue que el soporte de colágeno que se elabora sobre la cara apical de las membranas de insertos Transwell, se desprendió de las paredes de estos impidiendo la formación de una barrera de permeabilidad (Gualtero D., Tesis Doctoral 2018; Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2018; 2019). Por lo anterior, en esta tesis de maestría se propuso optimizar el modelo con el fin de que el inserto y el soporte de colágeno fabricado sobre él, actúen como barrera de permeabilidad. Igualmente, evaluar marcadores de disfunción endotelial en presencia de *A. actinomycetemcomitans*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedad periodontal (periodontitis)

Es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta irreversiblemente las estructuras de soporte de los dientes. Está asociada, pero no en todos los casos a factores de riesgo como la diabetes mellitus, obesidad, síndrome metabólico y osteoporosis, entre otros (Monzón *et al.*, 2017; Mozos & Stoian, 2019). Interacciones establecidas entre microorganismos patógenos (e.g.: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia*) y el sistema inmune del hospedador, desencadenan una respuesta inflamatoria que causa el hinchamiento y sangrado de las encías (Abusleme *et al.*, 2013; Mozos & Stoian, 2019). Esta etapa se conoce como gingivitis y es la forma más leve de la enfermedad. Cuando no es tratada, la microbiota presente en la cavidad oral se extiende e invade el tejido gingival, causando la irritación de las encías que conduce a la etapa crónica de la periodontitis (Mozos & Stoian, 2019).

La periodontitis se ha relacionado fuertemente con el desarrollo de lesiones ateromatosas y con la progresión de la aterosclerosis debido a que se ha aislado bacterias periodontales dentro de los ateromas (Konkel, O'Boyle y Krishnan, 2019; Kozarov, Dorn, Shelburne, Dunn y Progulsk-Fox, 2005). Al menos dos mecanismos biológicos pueden explicar la traslocación de las bacterias periodontales a las placas ateroscleróticas. Primero, la ulceración gingival permite que las bacterias periodontales (p. Ej., *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*) ingresen al torrente sanguíneo, causando bacteriemia, que se convierte en un estímulo aterogénico que desencadena la secreción de citocinas proinflamatorias como: IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Bourgeois, Inquimbert, Ottolenghi y Carrouel, 2019). El segundo mecanismo las bacterias periodontales, después de la fagocitosis, utilizan leucocitos circulantes para diseminarse a otros tejidos, incluidas las lesiones ateroscleróticas (Hajishengallis, 2015). El papel de los patógenos periodontales en la aparición y progresión de la aterosclerosis también ha sido ampliamente indicado por estudios epidemiológicos (Bale, Doneen y Vigerust, 2017).

Los periodontopatógenos y sus factores de virulencia modulan al sistema inmune e inducen respuestas inflamatorias que deterioran y afectan los mecanismos de defensa del

hospedero. Además, incrementan la virulencia de la comunidad microbiana presente en la cavidad oral y en el bolsillo periodontal que se forma en la enfermedad periodontal avanzada, e inducen respuestas citotóxicas mediadas por anticuerpos que destruyen el tejido (Im, *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que anticuerpos anti-*P. gingivalis* reaccionan de forma cruzada con proteínas de choque térmico expresadas en la superficie de las células endoteliales, contribuyendo al deterioro cardiovascular (Ettinger, *et al.*, 2014). Proteínas secretadas por periodontopatógenos presentes en la microbiota oral, como proteasas, también pueden afectar la respuesta inmune del hospedero al degradar interleucinas e inducir la proliferación de células de la musculatura lisa y la agregación plaquetaria (Mesa, *et al.*, 2019).

La respuesta inflamatoria local inducida por la microbiota dental activa en las células endoteliales la secreción de factores proinflamatorios, citocinas y especies reactivas de oxígeno, así como, la desregulación de metaloproteinasas (MMPs) de la matriz extracelular (Benakanakere & Kinane, 2012; Libby, Litchman & Hansson, 2013; Hajishengallis & Lamont, 2014). Este último fenómeno conduce a la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC), entre ellos el colágeno, alterando las interacciones célula-célula y célula-MEC normales (Mozos & Stoian, 2019). Las MMPs son endopeptidasas secretadas por células residentes y/o células inflamatorias, cuya expresión es activada por citocinas como IL-1 β y TNF- α (Hajishengallis & Lamont, 2014), de hecho, es probable que el mayor inductor de las MMP 1 y 3 en los fibroblastos sea la IL-1 β (Libby, Litchman & Hansson, 2013). Durante la periodontitis la migración de linfocitos, monocitos y leucocitos al tejido gingival conduce a la pérdida estructural de las fibras de colágeno, pues estas células secretan colagenasas que lo degradan (Séquier, *et al.* 2001). En la periodontitis, ya se ha demostrado el impacto que tiene el desequilibrio entre la síntesis y degradación de las MMPs en la degradación patológica de la MEC. Por eso, la detección de la forma activa de la MMP-9 podría ser un marcador de la gravedad clínica de esta patología (Séquier, *et al.* 2001; Barbosa-Ribeiro *et al.* 2019).

A medida que progresa la enfermedad intervienen otras citocinas, como IL-1 y RANK-L, que inducen la recesión gingival, la formación de bolsas periodontales y la activación de los osteoclastos. Posteriormente, se produce la reabsorción del hueso alveolar, la pérdida del ligamento periodontal y la pérdida del cemento dental que conducen a la pérdida de la pieza

dental (Echazú *et al.*, 2016). Se ha estimado que el área del epitelio ulcerado que recubre las bolsas periodontales en pacientes con periodontitis está entre 8 y 10 mm. La carga bacteriana en el surco gingival que se aproxima a una ulceración proporciona un portal para la entrada de los microorganismos a la circulación sistémica. Adicionalmente, en los vasos sanguíneos se encuentran células fagocíticas que también pueden transportar bacterias a sitios remotos.

Desde hace dos décadas se han reportado estudios que demuestran la presencia de varias bacterias en ateromas humanos. En los ateromas, formados por tejido cicatrizal y depósitos de grasa, se ha encontrado evidencia de la presencia de periodontopatógenos viables, entre ellos *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (El Kholy, *et al.* 2015; Mozos & Stoian, 2019). En países desarrollados, en donde la expectativa de vida es mayor, la prevalencia de patologías asociadas con la disfunción del endotelio es relativamente alta (Toyofoku, *et al.*, 2011). Desafortunadamente, a pesar de la evidencia que relaciona a la enfermedad periodontal con aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria y accidente cerebrovascular aún no se ha demostrado una relación causa-efecto entre ellas.

2.1.1. Respuesta inflamatoria en la cavidad oral durante la periodontitis

Al igual que otras barreras anatómicas, la mucosa oral está expuesta a estímulos físicos y químicos. Las células del sistema inmune innato como monocitos, leucocitos y polimorfonucleares juegan un papel importante como mediadores inmunoinflamatorios. Igualmente, la IgA secretada localmente por los queratinocitos con el fin de limitar la colonización de microorganismos patógenos y promover la respuesta inflamatoria (Echazú, *et al.*, 2016). Cuando se produce una lesión de la mucosa oral el organismo responde para repararla con un proceso en el que se distinguen principalmente tres etapas importantes: i) inflamación; ii) proliferación y iii) remodelación. La inflamación ocurre en los primeros minutos con el fin de detener el sangrado, prevenir infección y eliminar restos celulares (Smith & Martínez, 2018). La activación plaquetaria ocurre cuando la capa de células endoteliales se rompe y el colágeno de la matriz subyacente se expone, interactuando con las plaquetas y el factor de von Willebrand. Luego de la activación, se produce la agregación plaquetaria y la formación de la malla de fibrina que conducen a la formación del coágulo; el cual, sirve como soporte para las células sanguíneas que migran al sitio lesionado

durante la homeostasis. (Echazú, *et al.* 2016; Moutsopoulos & Konkel, 2018) Los neutrófilos son las primeras células en migrar del torrente sanguíneo a la lesión; estas células, secretan MMP-9 que a su vez activa VEGF para promover la revascularización. Posteriormente, la diapédesis de monocitos permite la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos y de material extraño. Finalmente, la migración de fibroblastos permite la secreción de proteasas que degradan al coágulo y lo reemplazan por proteínas de la familia del colágeno, que luego son remodeladas para restaurar la arquitectura normal del tejido (Echazú, *et al.* 2016).

La presencia de microbiota en la mucosa oral crea tolerancia inmunológica local. Sin embargo, después de la colonización por periodontopatógenos, los componentes de la microbiota se alteran y elevan la patogenicidad de la comunidad interrumpiendo la homeostasis tisular (Pan, Wang & Chen, 2019). En estas condiciones la respuesta inmune se activa, conduciendo la infiltración de células del sistema inmune, actividad osteoclástica y finalmente, la destrucción de tejidos blandos y duros (**Figura 1**).

La respuesta inmunológica del hospedero contra los periodontopatógenos ocurre inicialmente entre la microbiota disbiótica, el periodonto (células epiteliales y fibroblastos), células polimorfonucleares (PMN), células presentadoras de antígeno (APC) y subconjuntos específicos de células T (Th17) (Hajishengallis & Moutsopoulos, 2016), produciendo en primera instancia la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) que participan en la inflamación y en el reclutamiento, activación y diferenciación de células inmunes específicas que conducen a la destrucción del tejido (Pan, Wang & Chen, 2019).

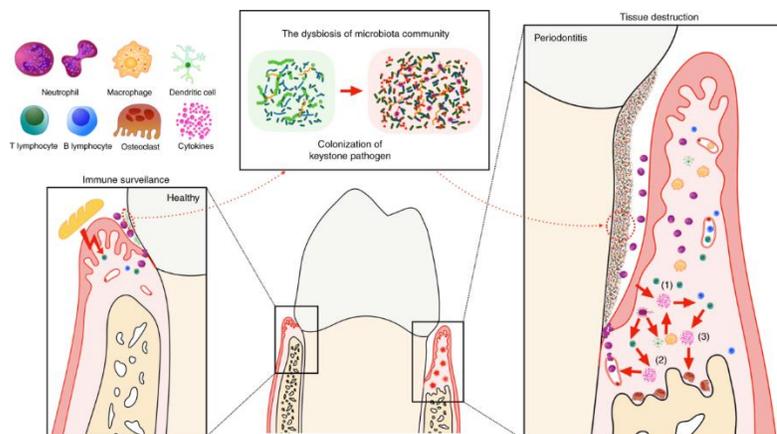


Figura 1. Papel de las citocinas en la periodontitis crónica. En condiciones normales, la respuesta inmunológica del hospedero esta equilibrada (Derecha). La disbiósis de la microbiota activa la respuesta inmune (Centro). La interacción entre la microbiota y las células del hospedero conduce a la secreción de citocinas; en presencia de periodontopatógenos, conduce a la destrucción del tejido (Izquierda). Tomado y modificado de Pan, Wang & Chen (2019).

2.2 Virulencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación con la aterosclerosis

A. actinomycetemcomitans es un cocobacilo Gram negativo, capnófilo, no móvil, catalasa positivo, indol negativo que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, y está fuertemente asociado con las formas agresivas de la periodontitis y con la progresión de la aterosclerosis (Henderson, *et al.*, 2010). La Leucotoxina, parece tener un efecto notable en la agresividad de la periodontitis (Höglund Åberg, *et al.*, 2013). Esta toxina se une al antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1) que es una molécula de células hematopoyéticas que induce la secreción de proteasas lisosomales de los neutrófilos e interleucina-1 β de los macrófagos (Johansson, *et al.*, 2000). Induce la β -hemólisis en los glóbulos rojos, aunque estas células carecen de la molécula LFA-1 en la superficie celular (Balashova, *et al.*, 2006). Se han descrito seis serotipos (a, b, c, d, e, f y g), según el antígeno polisacárido en la superficie celular, también existen cepas fenotípicamente no serotipables que carecen de expresión del serotipo-antígeno polisacárido específico. King & Tatum (1962), identificaron tres serotipos de *A. actinomycetemcomitans* no orales basados en un componente lábil al calor, así mismo, Zambon, *et al.*, (1983) distinguió tres serotipos (a, b, c) exclusivos de la cavidad oral.

El serotipo más fuertemente asociado con periodontitis en Estados Unidos fue el serotipo b (Suprith, *et al.*, 2018), mientras que se encontró que el serotipo a estaba elevado en sujetos con periodontitis crónica. En los sujetos finlandeses, los serotipos a y b con enfermedad periodontal y el serotipo c de controles periodontalmente sanos se aislaron con mayor frecuencia (Díaz-Zúñiga, *et al.*, 2012; Herbert, Novince & Krirkwood, 2016). La disrupción de las uniones de las células epiteliales y la invasión intraepitelial se ha demostrado *in vitro* con explantes gingivales aislados de ratas expuestas a *A. actinomycetemcomitans* (Damek-Poprawa, *et al.*, 2011). Por esta habilidad de invadir tejidos extraorales se ha asociado con

patologías como endocarditis, artritis bacteriana, abscesos cerebrales y osteomielitis (Herbert, Novince & Krirkwood, 2016). Factores de virulencia como la leucotoxina y toxina de distensión citoletal (Yilmaz & Lee, 2015), sugieren que *A. actinomycetemcomitans* está involucrada en la alteración de la respuesta inmune del hospedero y contribuye a la inflamación (**Tabla 1**). Estudios que evaluaron pacientes con periodontitis encontraron la presencia de esta bacteria en microbiota subgingival asociada a pérdida de tejido periodontal y niveles sanguíneos de IL-1 β e IL-8 elevados (Kelk, *et al.*, 2008). En ensayos *in vitro* con macrófagos estimulados con la leucotoxina (D7SS WT) de *A. actinomycetemcomitans* se demostró que esta sustancia induce respuesta proinflamatoria (Kelk, *et al.*, 2011). No obstante, la contribución de este patógeno y sus factores de virulencia con las formas agresivas y severas de la periodontitis es poco estudiada (Yilmaz & Lee, 2015; Gholizadeh, *et al.*, 2017).

Tabla 1. Factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* (modificado de Díaz-Zúñiga *et al.*, (2012).

Factores de virulencia	Efectos en el hospedero
Leucotoxina A (LtxA)	Inducción de apoptosis en neutrófilos
Lipopolisacárido O (LPS)	Liberación de citocinas proinflamatorias, activación de células dendríticas
Colagenasas y enzimas proteolíticas (EmaA)	Degradación enzimática de colágeno tipo I, II y IV
Toxina distensora citoletal (Cdt)	Inhibición del ciclo celular, alteraciones citopáticas y estructurales

En los ateromas de pacientes con enfermedad cardiovascular se han encontrado *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Prevotella intermedia* y su ADN (Mozos & Stoian, 2019). En un estudio con 50 pacientes realizado en Japón, se encontró que el 31% tenía patología cardiovascular -endocarditis o aneurisma- y que el 46% de estos pacientes tenían *A. actinomycetemcomitans* dentro de la microbiota **periodontal** (Nakano, *et al.*, 2007). Mediante qPCR de muestras de sangre provenientes de individuos que realizaron limpieza interdental se detectó la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (Ambrosio, *et al.*, 2019). Los periodontopatógenos y sus factores de virulencia estimulan los glóbulos blancos, fibroblastos, células dendríticas y endoteliales causando

inflamación e induciendo la expresión de MMP, especialmente MMP-2, que degradan la matriz extracelular gingival (Gholizadeh, *et al.*, 2017). La subsecuente presencia de MMP en la sangre puede causar inflamación miocárdica, sobrecarga de presión, hipertrofia miocárdica, intersticial y fibrosis perivascular relacionadas disfunción sistólica y diastólica (Mozos & Stoian, 2019).

2.3 Endotelio vascular: células y función

El endotelio es un tejido que recubre el sistema vascular y está compuesto por una monocapa de aproximadamente 1×10^{13} células endoteliales (CE) con aproximadamente 1 kg de peso (Sumpio, Riley & Dardik, 2002). Es versátil y multifuncional con propiedades metabólicas que incluyen la regulación de eventos como la trombosis y la trombolisis, la adherencia plaquetaria, la modulación del tono muscular y del flujo sanguíneo y la regulación de la respuesta inmune (Rajendran, *et al.*, 2013). La alteración del endotelio conduce a estados patológicos como aterosclerosis, disfunción hemostática y alteraciones inflamatorias (Gimbrone, & García-Cardena, 2016).

El endotelio es una barrera de permeabilidad que controla el paso de células y moléculas de la sangre a los tejidos; la integridad funcional de la MEC que lo subyace mantiene las paredes de los vasos sanguíneos y la función circulatoria (Rajendran, *et al.*, 2013). Las CE que constituyen el endotelio establecen relaciones dinámicas con las células de la sangre y el tejido vascular que este recubre, mediante señales paracrinas que influyen a las plaquetas, los leucocitos y las células de músculo liso subyacente (Sumpio, Riley & Dardik, 2002; Félétou, 2011). En condiciones basales, las CE mantienen a la sangre en fase líquida mediante la regulación de elementos trombogénicos y la secreción de sustancias activas - como la prostaciclina y óxido nítrico- que inhiben la agregación plaquetaria. La exposición del colágeno presente en la matriz subendotelial después de que ocurre un daño endotelial activa al factor von Willebrand sintetizado por las células endoteliales, promueve la agregación y adhesión plaquetaria y activa la cascada de la coagulación requeridas para que ocurra la formación del coágulo (Kisling, Lust, & Katwa, 2019) (**Figura 2**).

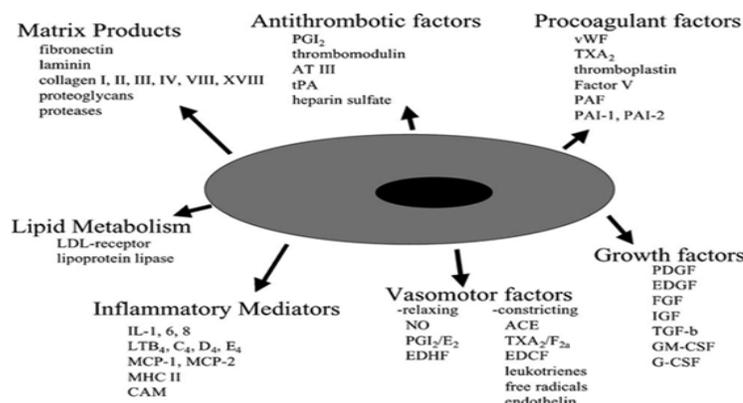


Figura 2. Papel regulador de las células endoteliales. Se muestran los factores secretados por las células endoteliales que modulan la función endotelial (modificado de Sumpio, Riley & Dardik. 2002).

La pared arterial se compone de tres capas principales: túnica íntima, túnica media y adventicia (**Figura 3**). La túnica íntima es la capa más interna de los vasos sanguíneos; está constituida por el endotelio, el subendotelio (formado por un estrato celular y tejido conectivo rico en diversas proteínas de la familia del colágeno) y una lámina elástica interna (Saxton & Manna, 2019). La túnica media se localiza entre la íntima y la adventicia; está constituida por fibras de musculo liso, fibras elásticas, fibras de colágeno tipo I y tipo III, y proteoglicanos. La túnica adventicia es la capa más externa; está compuesta por fibras de colágeno tipo I, fibras elásticas, glicosaminoglicanos y fibroblastos (Kennedy & Touyz, 2019).

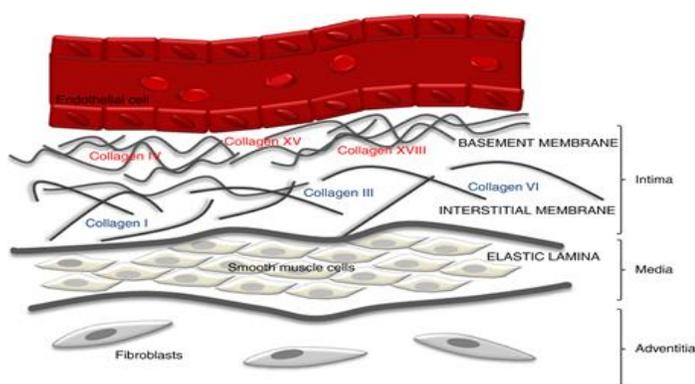


Figura 3. Representación esquemática de una arteria. La figura muestra las tres principales capas: íntima, media y adventicia. En la íntima, los colágenos de la membrana basal incluyen colágeno tipo IV, XV y XVIII; los de la matriz intersticial incluyen los colágenos tipo I, III y VI. (Modificado de Manon-Jensen, Kjeld & Karsdal.2016).

La MEC del tejido subendotelial está constituida por proteínas de la familia del colágeno, laminina, fibronectina y vitronectina. La distribución y el contenido de las proteínas de la MEC varían según el tipo de vaso sanguíneo; en arterias y venas, el colágeno y la elastina constituyen más de la mitad de la masa de la pared del vaso (Manon-Jensen, Kjeld & Karsdal, 2016). La MEC que subyace al endotelio de los vasos vasculares está conformada por una membrana basal y luego por una matriz intersticial que comunica a las células y amortigua el estrés que sufren los vasos. La membrana basal que subyace a las células endoteliales ancla a las células endoteliales para que puedan formar la monocapa endotelial que recubre internamente los vasos sanguíneos. Es densa, altamente reticulada y está compuesta por proteínas que soporte estructural y modular las funciones celulares (McCoy, Seo, Choi & Fischbach, 2016). La matriz intersticial está compuesta por sales, fluidos, polisacáridos y colágenos fibrilares que llenan los espacios intersticiales entre las células (Barbosa-Ribeiro *et al.* 2019).

En las membranas basales el colágeno tipo IV y la laminina son estabilizadas mediante puentes de nidogen y perlecan (Manon-Jensen, Kjeld & Karsdal 2016). Cuando ocurre un daño del endotelio la membrana basal se degrada y luego la matriz intersticial. El colágeno tipo IV pertenece a las proteínas con dominios del factor A de von Willebrand que son importantes para la diferenciación celular, migración y adhesión de monocitos y de respuesta inmune (McCoy, Seo, Choi & Fischbach, 2016).

En la respuesta inmune, las CE regulan el movimiento de leucocitos y linfocitos hacia los tejidos (Al-Saoudi, Kaaji & Tas, 2017). A diferencia de los leucocitos y plaquetas, los linfocitos pueden interactuar con las CE bajo condiciones normales a través del receptor L-Selectina. Una vez activados, los linfocitos expresan integrinas (e.g.: LFA-1 o VLA-4) que interactúan con las moléculas de adhesión del endotelio VCAM, ICAM-1 y 2. El receptor de ICAM-2 es expresado fundamentalmente en CE en reposo; a diferencia de ICAM-1 y VCAM que se expresan en presencia de lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano. Las CE activadas quimioatraen neutrófilos (El Kholy *et al.*, 2015; Pan, Wang & Chen, 2019) y permiten la adhesión, rodamiento y extravasación de los leucocitos a los sitios donde hay daño tisular (Skaria, Bachli & Schoedon, 2017).

2.4 Estructura y función del colágeno

La familia de proteínas del colágeno es la más abundante en mamíferos. A ella pertenecen proteínas que se caracterizan por poseer una hélice hecha de tres péptidos de la misma longitud; los cuales, están constituidos por la tripleta (Gly-X-Y) que se repite n veces y en los que X y Y corresponden a los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Sorusanova, *et al.*, 2019). Se han descrito 28 tipos de colágeno que se identifican con números romanos del I al XXVIII (Dong & Ly, 2016). Dependiendo del tipo de colágeno, la triple hélice puede representar entre el 96% y menos del 10% de toda la molécula (Gelse, Poschl & Aiger, 2003). Existen varias subfamilias de colágenos, una de ellas es la de los colágenos fibrilares a la que pertenecen los colágenos tipo I, II, III; V; IX; XXIV y XXVII (Chattopadhyay & Raines, 2014). A la fecha se han identificado 40 genes que codifican para los péptidos que conforman las hélices, los cuales forman homotrímeros o heterotrímeros dependiendo del tipo de colágeno. Las células que sintetizan colágenos fibrilares -como los fibroblastos- secretan al espacio extracelular los péptidos en forma de triple hélice – tropocolágeno- en donde se autoensamblan formando fibrillas de colágeno que son entrecruzadas por la enzima lisil-oxidasa para formar las fibras de colágeno (**Figura 4**). El tamaño y complejidad aumentan con las modificaciones postraduccionales y con el autoensamblaje. El colágeno tipo I es la proteína más abundante en la naturaleza. Representa alrededor del 90% de la masa orgánica del hueso y es el constituyente principal de la piel, los tendones, ligamentos, córnea, dermis y tejido conectivo oral Sorushanova *et al.*, (2019).

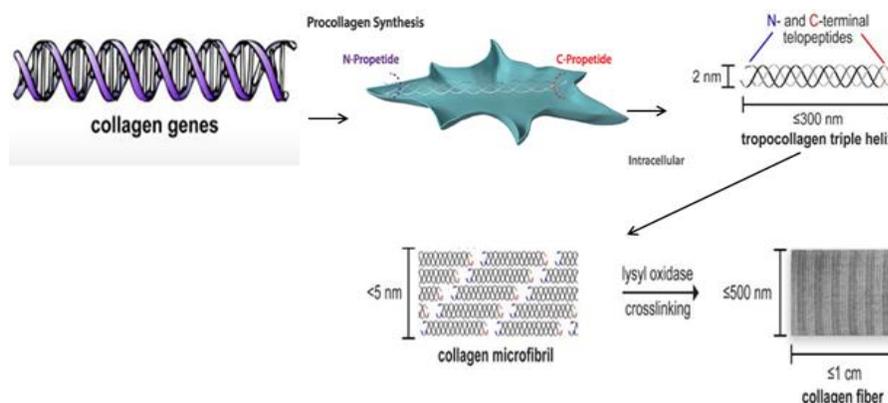


Figura 4. Ruta biosintética del colágeno fibrilar. Tomado y modificado de: Sorushanova *et al.*, (2019).

2.4.1 Colágeno tipo I como biomaterial

El colágeno tipo I es extraído de animales. Las fuentes naturales para las aplicaciones biomédicas son piel y tendón bovinos, porcinos e intestino, vejiga y cola de roedores. El colágeno también puede producirse por expresión heteróloga en células de mamíferos, insectos o levaduras (Chattopadhyay & Raines, 2014). La utilización de cada una de las fuentes mencionadas depende de su uso y del rendimiento que se quiera lograr (**Tabla 2**). Para su extracción y purificación, no se pueden usar solventes orgánicos porque el colágeno es insoluble en ellos; sin embargo, puede disolverse en soluciones acuosas de ácido acético y en soluciones de colagenasa (Dong & Ly, 2016; Chattopadhyay & Raines, 2014). Las dispersiones de las moléculas de colágeno y las soluciones de los productos de su degradación con colagenasa permiten obtener geles (dispersiones coloidales de colágeno no entrecruzadas), hidrogeles (dispersiones coloidales de colágeno entrecruzadas) y soportes o matrices porosas que resultan de la liofilización de los geles o hidrogeles (Sheehy Cunniffe & O'Brien, 2018). Todos estos sistemas han sido utilizados en la obtención de cultivos celulares tridimensionales (3D) (Walters & Stegemann, 2014).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las preparaciones de colágeno tipo I de diversas fuentes. Tomado y modificado de: Soroushova, *et al.* (2019).

Fuente	Ventajas	Desventajas
Colágeno extraído de tejido animal	Alto rendimiento La extracción con ácido/ pepsina elimina la secuencia determinante p antigénica	Potencial de transmisión de enfermedades entre especies
Colágeno producido de forma recombinante	Baja respuesta inmune	Bajo rendimiento Problemas de estabilidad
Colágeno producido <i>in vitro</i> en células humanas	Puede ser autólogo	Bajo rendimiento

2.5 Modelos de cultivo celular endotelial *in vitro* en el estudio de patogenicidad

Los cultivos *in vitro* han sido utilizados, entre otras cosas, para estudiar la interacción entre las bacterias y un tipo de célula específica. En ellos se han descrito mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia utilizados por las bacterias patógenas periodontales (periodontopatógenos) que interactúan con diferentes tipos de células endoteliales (Gualtero, Lafaurie & Fontanilla., 2018). Los primeros modelos celulares en ser desarrollados con este fin fueron los cultivos 2D; con ellos, se han publicado varios trabajos que evalúan las interacciones entre las células endoteliales y las bacterias (Millán *et al.*, 2013; Antoni *et al.*, 2015). Estudios realizados con cultivos 2D de células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC), arteriales humanas (HAEC) y de arteria coronaria humana (HCAEC) han ayudado a determinar el papel de las bacterias periodontales y sus antígenos en la disfunción endotelial relacionada con la aterosclerosis. Por ejemplo, en cultivos de HAEC se demostró que el LPS de *P. gingivalis* activa la proteína quinasa activada por mitógenos MAPK-p38 y regula la expresión de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), ambas involucradas en la respuesta inflamatoria (Liu *et al.*, 2012). Igualmente, la capacidad de invadir las células endoteliales que tienen *P. gingivalis* cepas W83 y 33277 (Rodrigues *et al.*, 2012). De hecho, ésta última cepa ha sido la empleada como modelo para estudiar los mecanismos de patogenicidad de los periodontopatógenos (Kebschull, Demmer & Papapanou, 2010; Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2018).

Los modelos 3D se han empleado con el fin de obtener un sustrato fibrilar discontinuo, de adhesión que sirve como barrera estérica para el movimiento celular, de manera similar a los tejidos *in vivo* (Wolf, *et al.* 2009). A partir de lo anterior, es posible realizar un ensamblado de novo de las fibras de colágeno gracias a las modificaciones de superficie y de caracterización propias de la ingeniería de tejidos, que han permitido grandes avances en el estudio de migración e invasión celular *in vitro* (Friedl & Wolf 2010). Estos cultivos 3D se hacen con geles, hidrogeles o soportes elaborados con proteínas de la matriz extracelular - colágenos tipo I, II, IV; fibrina; proteoglicanos; elastina – que proporcionan el sustrato de siembra de las células (Dong & Lv, 2016). También, con otros polímeros de origen natural - quitosano - o biomateriales sintéticos como la caprolactona. Cuando son geles o hidrogeles las dispersiones coloidales con las que se forman se mezclan con las

células, para que una vez formado los geles estos queden contenidos en el mismo. Este tipo de modelo celular ha sido empleado para el estudio de angiogénesis, migración celular en cáncer, neovascularización y para el estudio de disfunción endotelial DelNero *et al.*, (2015). Soportes de este tipo que incluyen fibroblastos que se han usado como sustrato para sembrar células endoteliales, las cuales fueron capaces de formar monocapas confluentes y que expresan PECAM-1. Este tipo de modelo se ha usado para el estudio de mecanismos de vascularización (Brown *et al.*, 2005; Alekseeva *et al.*, 2014).

Debido a que el colágeno tipo I hace parte de la lámina reticular de la membrana basal del endotelio, nuestro grupo creó un modelo de cultivo 3D para cultivar células endoteliales humanas y evaluar su respuesta a LPS de periodontopatógenos. El modelo está basado en producir en la cara apical de insertos Transwell una membrana de colágeno tipo I, sobre la que se siembran células endoteliales (Gualtero D, Tesis Doctoral, 2018; Gualtero, Lafaurie, & Fontanilla, 2018; 2019). Con él se demostró que el perfil de secreción de los cultivos 3D y 2D de HCAEC es diferente y que la respuesta al estímulo con LPS de periodontopatógenos también es diferente. Los modelos celulares *in vitro* basados en el uso de componentes de matriz extracelular pueden dilucidar las características *in vivo* que permiten proporcionar evidencia experimental de los mecanismos empleados por las bacterias periodontopatógenas para afectar al endotelio (Gualtero D, Tesis Doctoral, 2018).

Ensayos *in vitro* que emplean monocapas de células endoteliales cultivadas sobre soportes tridimensionales de colágeno I han permitido para evaluar la función de barrera endotelial (Gualtero D, Tesis Doctoral, 2018) y la intravasación, extravasación y permeabilidad del endotelio (Islam, *et al.*, 2016). Sin embargo, todavía no se dispone de un modelo *in vitro* con un valor de permeabilidad similar al del endotelio *in vivo* y que contenga los componentes celulares y extracelulares de los vasos tridimensionales (Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2018).

Los mecanismos *in vivo* de la aterosclerosis son complejos y multivariantes. Por eso, es importante dilucidar los mecanismos que subyacen la enfermedad con el fin de encontrar las mejores opciones terapéuticas. Aunque se han utilizado modelos animales, la enfermedad difiere en función del modelo escogido lo que dificulta la interpretación de los resultados. A lo anterior, se suman las implicaciones éticas asociadas con la

experimentación en animales (Weber & Hoerstrup, 2014; Islam, *et al.*, 2016). Los soportes a base de colágeno son utilizados en ingeniería de tejidos para recrear estructuras 3D en donde se pueden cultivar células (Fontanilla & Espinosa, 2012).

En el Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia, se hicieron cultivos sembrando fibroblastos aislados de mucosa oral de conejo en soportes de colágeno tipo I. Los datos mostraron que el perfil de secreción de factores solubles de las células en estos cultivos difería del que mostraron en cultivos 2D (Fontanilla & Espinosa, 2012). El grupo también demostró que fibroblastos orales sembrados en soportes de colágeno I con poros orientados de manera diferente (unidireccional vs multidireccional) exhiben morfología celular y perfil de secreción de factores solubles diferentes (Bustos *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que las características microestructurales de los soportes tridimensionales inducen respuestas celulares diferentes a las observadas cuando las células se cultivan en 2D, sobre la superficie de poliestireno de los platos de cultivo.

La mayoría de los modelos 3D que se usan para el estudio *in vitro* de las células endoteliales han empleado células embebidas en matrices de colágeno I obtenidas por deshidratación del hidrogel que las contiene (Methe & Edelman, 2006; Methe, Hess & Edelman, 2007; 2008; Hess *et al.*, 2009; Indolfi, Baker & Edelman, 2012; Murikipudi, Methe & Edelman, 2013). Las células endoteliales embebidas en matrices de gelatina retienen la capacidad secretoria exhibida por las células endoteliales quiescentes (Methe, Hess & Edelman, 2008). También, su capacidad de secretar quimiocinas que modulan inflamación local y reparación de tejidos a través de NF- κ B (Hess *et al.*, 2009). Cuando se estimulan con TNF- α células HUVEC incluidas en geles 3D de colágeno hidrolizado o gelatina, exhiben menor adhesión de monocitos humanos THP-1 y secreción de MCP-1 que HUVEC cultivadas en 2D (Indolfi, Baker & Eldman, 2012). En esta clase de cultivos 3D también se ha detectado la expresión de colágeno IV, laminina, proteoglicanos -componentes de la membrana basal del endotelio y fibronectina (Murikipudi, Methe, & Edelm, 2013), proteína que juega un papel importante durante la tubulogénesis vascular (George, Baldwin, & Hynes, 1997; Alekseeva *et al.*, 2014).

2.6 Modelos de interacción monocito-célula endotelial

Los mecanismos que conllevan al desarrollo de un proceso aterosclerótico son complejos e implican eventos bioquímicos y celulares. La lesión en la capa endotelial de la pared vascular que inicia la activación de monocitos es el evento primordial de este proceso. Cuando las CE se activan, expresan moléculas de adhesión-1 (VCAM-1) y secretan quimiocinas que atraen leucocitos y los retienen en la pared arterial. La activación de monocitos, su migración transendotelial y diferenciación dentro del endotelio son influenciadas por la proteína quimiotáctica de macrófagos-1 (MCP-1) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Islam, *et al.*, 2016).

Los modelos *in vitro* han permitido estudiar la adhesión y migración de los monocitos a través del endotelio y su adhesión a monocapas endoteliales estimuladas con LPS o fimbrias de *Porphyromonas gingivalis* (Nakamura *et al.*, 2008). Evaluando la asociación entre la enfermedad aterosclerótica y la periodontitis se encontró que MIF facilita la adhesión de los monocitos a las células endoteliales regulando la expresión de ICAM-1 en presencia de *P. gingivalis* (Rocco, Bakaletz & Goodman, 2018). La proteína MIF es un factor soluble -expresado por linfocitos T, monocitos, fibroblastos, células endoteliales y adipocitos- que estimula la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL1 β , IL-8, IFN- γ y TNF- α . En modelos *in vitro* basados en cultivos en monocapa (2D) de la línea de células endoteliales EA.hy926, se encontró que *P. gingivalis* incrementa la expresión de ICAM-1, citocinas proinflamatorias y quimiocinas que reclutan monocitos en el endotelio vascular, lo cual, *in vivo* puede conducir a la formación de placas ateroscleróticas (Wu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2011). La adhesión de monocitos al endotelio es mediada por la unión de los receptores TLR-2 y TLR-4 al LPS y por la secreción aumentada de IL-8 y MCP-1 que estabiliza esta unión (Hashizume, Ochiai & Yamamoto, 2011). A pesar de esto, los mecanismos por los cuales la infección por un microorganismo específico induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales todavía no son conocidos en su totalidad (Xu, *et al.*, 2018).

Aunque en pacientes con periodontitis se ha reportado inflamación sistémica, los mecanismos por los que periodontopatógenos son capaces de activar a las células endoteliales y producir enfermedad cardiovascular no son claros. En cultivos 2D de

monocapas de HCAECs estimuladas con LPS de *A. actinomycetemcomitans* se observó el incremento de IL-8, IL-6, ICAM-1 y PECAM-1 con respecto al control, sugiriendo que el LPS de esta bacteria induce una respuesta endotelial proinflamatoria (Gualtero, *et al.*, 2017). En otro trabajo, se obtuvieron monocapas endoteliales confluentes sembrando HCAEC en la superficie de soportes de colágeno de tipo I hechos sobre la superficie apical de insertos Transwell™ (cultivo 3D). Al exponer las monocapas a LPS de *A. actinomycetemcomitans* (Aa-LPS) o *P. gingivalis* (LPS-Pg) se encontraron diferencias en la transcripción de los genes COX-2, eNOS y vWF y en el perfil de secreción de citocinas con respecto a monocapas obtenidas sobre la superficie de poliestireno de frasco de cultivo (cultivo 2D). Además, se encontró que el perfil de secreción de las HCAEC expuestas a LPS-Aa o LPS-Pg diferían entre los dos modelos (Gualtero D., Tesis Doctoral, 2018; Gualtero, Lafaurie, & Fontanilla, 2018; 2019).

A pesar de que en el modelo 3D descrito las HCAEC a los 7 días de cultivo formaron monocapas confluentes, los bordes del inserto y por ende las monocapas se separaron de las paredes del inserto impidiendo la formación de una barrera de permeabilidad. Teniendo en cuenta que la construcción de un modelo celular *in vitro* debe reproducir las condiciones fisiopatológicas del endotelio (Cui *et al.*, 2019), esta tesis propuso optimizar el proceso de elaboración del soporte para lograr que sus bordes se unan a las paredes internas del inserto y de este modo, lograr que las monocapas confluentes de HCAEC actúen como barrera de permeabilidad. También, estudiar la expresión de marcadores de disfunción endotelial después de infectar las monocapas confluentes obtenidas en el modelo 3D con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Optimizar un cultivo celular 3D de células endoteliales para estudiar el efecto de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en la expresión de marcadores de disfunción endotelial.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Estandarizar un procedimiento para obtener soportes de colágeno tipo I que formen barrera de permeabilidad en la cámara apical de insertos Transwell.

3.2.2 Caracterizar fisicoquímica y estructuralmente el sistema desarrollado.

3.2.3 Evaluar el crecimiento de células endoteliales sobre el soporte desarrollado.

3.2.4 Evaluar el efecto de infectar el modelo 3D de células endoteliales con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales y equipos

A continuación, se enlistan los reactivos, materiales y equipos utilizados dentro de la presente investigación para luego describir la metodología empleada.

4.1.1. Reactivos

- PBS (Solución tamponada de sales de fosfato, pH 7.3-7.6).
- Paraformaldehído (CAS 30525-89-4; No. Catálogo: 104005, Merck Millipore).
- Etanol Absoluto (CAS 64-17-5; No. Catálogo: 107017, Merck Millipore).
- Xileno (CAS 95-47-6; No. Catálogo: 109798, Merck Millipore).
- Parafina Histosec® No. Catálogo: 111609, Merck Millipore).
- Hematoxilina en solución modificada según Gill III (No. Catálogo: 105174, Sigma Aldrich).
- Eosina A al 0.5% en solución acuosa (No. Catálogo 109844, Sigma Aldrich).
- Medio Basal Endotelial Clonetics™ EGM™-2 BulletKit™ (EGM-2V) (Catálogo No. CC-3162 Lonza; USA).
- Buffer HEPES (Catálogo No. CC-5022; Lonza, USA).
- Tripsina EDTA (Catálogo No. CC-5022; Lonza, USA).
- Solución Neutralizante de Tripsina (TNS) (Catálogo No. CC-5022; Lonza, USA).
- Solución de Azul de Tripán al 0.4% (No. Catálogo: T8154, Sigma Aldrich).
- Medio RPMI 1640 (ATCC, Catálogo No. 30-2001).
- Suero Fetal Bovino (SFB) (No. Catálogo: F2442, Sigma Aldrich).
- Glutaraldehído (No. Catálogo: 354400, Sigma Aldrich).
- Kit LIVE/DEAD® Viabilidad / Citotoxicidad (No. Catálogo: L3224, Invitrogen™).
- Glicina 1 M (CAS 56-40-6; No. Catálogo: 67419, Sigma Aldrich).
- Solución Triton™ X-100 (No. Catálogo: 93443, Sigma Aldrich).
- Suero de Cabra (No. Catálogo: G6767, Merck Millipore).
- Albúmina (No. Catálogo: A9418, Sigma Aldrich).
- Faloidina de Rodamina (5:200, No. Catálogo: R415, Invitrogen™).

- Medio de Montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (No. Catálogo: ab104139, Abcam).
- FITC Dextrano 3kD (No. Catálogo D-3306, Invitrogen™).
- EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético (CAS 600-00-4; No. Catálogo: E9884, Sigma Aldrich).
- Agar BHI (Infusión Cerebro Corazón; No. Catálogo: 113825; Merck Millipore).
- Calceína AM (No. Catálogo: C1430; Invitrogen™).
- Kit CytoSelect™ (96 Well Cell Migration Assay; 5µm, Fluorometric Format) (Cat. Number: CBA-105; Cell Biolabs Inc).
- Kit LEGEND-Plex® Human Inflammation Panel (8-Plex) (BioLegend, USA).
- Kit Quantikine® ELISA Human TGF-β1 (R&D Systems®, Catálogo: DB100B, USA).

4.1.2. Materiales

- Insertos Transwell™ (Corning®; No. Catálogo: 3428; tamaño de poro 8 µm, 24 mm diámetro)
- Insertos Transwell™ (Corning®; No. Catálogo: 3401; tamaño de poro 0.4 µm, 12 mm diámetro)
- Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC) (Lonza, Catálogo CC-2585, USA).
- Monocitos Humanos THP-1 (ATCC® TIB-202™).
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Serotipo b- ATCC 29522).
- LPS-(Aa) Purificado (Serotipo b, ATCC 29522).

4.1.3. Equipos

- Liofilizador: Vir Tis Advantage ES-53.
- Microscopio electrónico de barrido TESCAN VEGA 3.
- Espectrofotómetro IRAffinity-1S (Shimadzu, Japón).
- Micrótopo giratorio (CUT 5062, SLEE).
- Microscopio de luz (Elipse 50i, Nikon).
- Cámara digital acoplada a microscopio de luz (Nikon, DS-5M-L1).

- Estereoscopio de luz (Stemi DV4 Series, Carl Zeiss, Germany)
- Microscopio de fluorescencia (Axio imager; CarlZeiss, Germany).
- Sistema de secado de punto crítico (CPD) (Quorum K850, East Sussex, Reino Unido).
- Ion Sputter Coater, COXEM SPT-20
- Lector de microplacas para absorbancia (TECAN, Infinite 200 Pro).
- Citómetro de flujo BD FACS (Acuri ® C6 Plus).
- Lavador de Microplacas para Elisa (Wellwash™, Thermo Scientific)

4.1 Elaboración de los soportes de colágeno tipo I

El proceso de purificación y obtención de dispersiones de colágeno tipo I de origen bovino fue realizado siguiendo protocolos establecidos por el Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos de la Universidad Nacional de Colombia (Espinosa, Sosnik, & Fontanilla, 2010; Suesca E. Tesis Doctoral, 2013; Bustos *et al.*, 2014; Suesca *et al.*, 2017).

En la primera etapa de esta investigación, se optimizó el procedimiento para elaborar soportes de colágeno tipo I cuyos bordes no se retrajeran de las paredes internas de los insertos Transwell™ empleados para la elaboración del modelo 3D, durante los procesos de congelación y liofilización. Para esto, se evaluaron los siguientes parámetros: i) tres concentraciones de colágeno (5, 8 y 10 mg/g); ii) dos diámetros del inserto (24 y 12 mm); iii) dos pesos de las dispersiones de colágeno servidas en la membrana del inserto (**Tabla 3**).

Tabla 3. Descripción de las variables para la estandarización de los soportes de colágeno tipo I en insertos Transwell™.

Concentración colágeno (mg/g)	Diámetro del inserto (mm)	Peso (g) de colágeno servido en inserto	Tratamiento de congelación por 24 horas en liofilizador empleando una rampa de temperatura desde 20 °C hasta -28 °C, con una tasa de enfriamiento de -1 °C/min Presión: 760 mTorr por 24 h
5	24	0.5	
8		1.0	
10			
5	12	0.1	
8		0.2	
10			

4.2 Caracterización de los soportes de colágeno tipo I

4.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Imágenes representativas de los soportes obtenidas con SEM, se utilizaron para determinar el tamaño de poro y la retracción de los soportes de colágeno. Las micrografías se capturaron con el programa EasySEM. Los soportes se pre-trataron con el método de pulverización catódica. La película de oro se depositó sobre las muestras no conductoras, mejorando la calidad de la imagen al evitar la acumulación de electrones.

4.2.2 Determinación de tamaño de poro de los soportes de colágeno

A partir de las imágenes de SEM obtenidas se evaluó el tamaño de poro de los soportes, usando el software Image J® 1.39u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Los ejes mayor y menor de la elipse que mejor se ajustaron a los poros evaluados fueron medidos y promediados. El promedio de las mediciones de 50 poros escogidos al azar fue utilizado para calcular el tamaño de poro siguiendo metodología descrita por el Grupo de trabajo de Ingeniería de Tejidos (Suesca *et al.*, 2017). Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.2.3 Determinación de los porcentajes de porosidad e hinchamiento de los soportes de colágeno

El porcentaje de porosidad e hinchamiento de los soportes de colágeno fue determinado por el método de desplazamiento de líquido modificado, según metodología descrita (Ho & Hutmacher, 2006). Se sirvió 1mL de PBS en placas de cultivo de 6 pozos. Luego, se sumergieron los segmentos de los soportes (2 cm²) por 15 min (20 °C) y se desgasificaron al vacío por 10 min. Posteriormente, los soportes se colocaron en un picnómetro con 15 mL de PBS (20 °C) y se midió el volumen total del sistema. Después de retirar las muestras, se pesó el volumen remanente en el picnómetro con el PBS. Los ensayos se realizaron por triplicado y la porosidad fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Porosidad} = 1 - \left(\frac{\text{Volumen del Soporte Real}}{\text{Volumen del Soporte Húmedo}} \right) \times 100$$

La determinación del porcentaje de hinchamiento se hizo con el mismo procedimiento empleado para determinar la porosidad. Las muestras sumergidas en PBS y mantenidas a 4 °C en se analizaron a las 24, 48 y 72 h. Las mediciones se realizaron por triplicado y el porcentaje de hinchamiento de cada muestra se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Hinchamiento} = \frac{\text{Volumen del Soporte Real}}{\text{Volumen del Soporte Húmedo}} \times 100$$

4.2.4 Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron soportes liofilizando dispersiones de colágeno tipo I con las concentraciones evaluadas (5, 8 y 10 mg/g) que fueron servidas en la membrana de policarbonato de la cara apical de insertos Transwell™ (24 mm). Luego, se desprendieron cuidadosamente de la membrana y se recortaron para obtener muestras de 1 cm² que fueron analizadas con un espectrofotómetro equipado con una celda de reflectancia total atenuada (ATR) a un intervalo espectral de 400 a 5000 cm⁻¹, con una resolución de 4 cm⁻¹ y promediando 60 a 128 escaneos.

4.2.5 Evaluación histológica de los soportes de colágeno

Los soportes de colágeno tipo I (5, 8 y 10 mg/g,) se fijaron en PFA al 4% (20 min). Luego se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes (70, 80, 90, 100 % v/v), se aclararon en Xilol, se embebieron en Parafina y se cortaron (5 µm de grosor) con un micrótopo giratorio. Los cortes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), las imágenes se capturaron con cámara digital (Nikon) acoplada al microscopio de luz.

4.3 Cultivo celular

4.3.1 Células Endoteliales de Arteria Coronaria Humana (HCAEC)

Se descongelaron células HCAEC en pasaje 3, se sembraron (5000 células/cm²) en frascos de cultivo (25cm²) y se incubaron (37 °C, CO₂, 5%) con medio EGM-2V, suplementado con Suero Fetal Bovino al 5%, Ácido Ascórbico, Hidrocortisona, Factor 1 de Crecimiento Similar a Insulina R-3 (R3-IGF-1), Factor de Crecimiento Epidermal humano (hEGF), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Fibroblástico Humano Beta (FGF-β). El medio de cultivo se cambió cada 48 h hasta que las células alcanzaron entre 85 a 90% de confluencia. Para ampliar la población celular, los cultivos se lavaron con buffer HEPES, se digirieron con Tripsina EDTA y se lavaron con una solución (TNS). Después de centrifugar (1.350 rpm, 5 min) el pellet celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se evaluó la viabilidad celular con Azul de Tripán. Para cada pasaje se sembraron 750.000 células en frascos de 75cm² y se cultivaron en las condiciones descritas hasta que alcanzaron una confluencia menor al 85%. En los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron HCAEC en pasaje 5, 7,9 y 11.

4.3.2 Línea celular de monocitos humanos THP-1

Se utilizó la línea celular de monocitos Humanos THP-1. Se descongelaron dos viales de las células criopreservadas a (-80 °C) y se sembraron en frascos de cultivo (25 cm² y 75 cm²) en medio RPMI con Suero Fetal Bovino al 10%. Los cultivos fueron incubados (37 °C, 5% CO₂) durante 20 días.

4.3.3 Cultivo tridimensional de células HCAEC (3D-HCAEC)

Para preparar los soportes se sirvieron 0,2 g de una dispersión de colágeno tipo I (10 mg/g) en la cara apical de insertos Transwell™, se congelaron y se liofilizaron durante 24 h. Luego, la cara apical de los insertos se irradió con luz UV (15 min), se invirtió el inserto y se irradió la cara basal (15 min) para esterilizarlos. En cada inserto Transwell™ se sembraron 5x10⁵ HCAEC resuspendidas en 250 µL medio EGM-2V, se dejaron adherir (30 min, 37 °C 5% CO₂) y luego se adicionaron 250 µL de medio fresco, cambiando el medio cada 48 h durante

7 día (**Figura 5**). En cada pozo el volumen total de medio usado en la cámara apical y basolateral del inserto fue 500 μL y 1000 μL , respectivamente. A diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 días) se realizaron mediciones (viabilidad, permeabilidad, histología y análisis SEM).

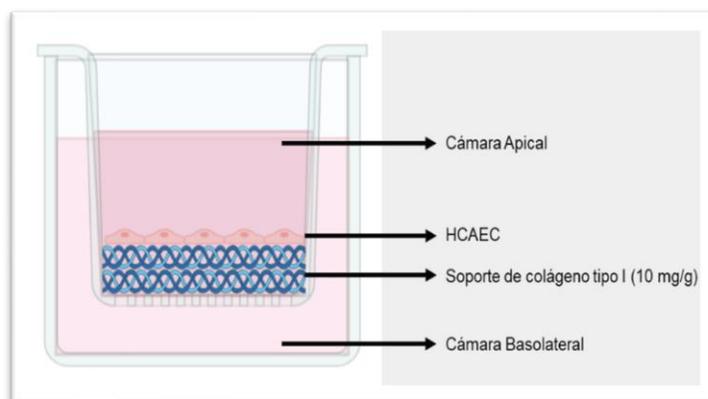


Figura 5. Esquema del cultivo 3D-HCAEC

4.3.3.1 Análisis morfológico e histológico de los cultivos 3D-HCAEC

Se tomaron cultivos 3D-HCAEC incubados a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 días) y se tiñeron con el Kit LIVE/DEAD siguiendo las indicaciones del fabricante. Las soluciones A (Calceína AM) y B (Homodímero de Etidio) proporcionadas por el kit se mezclaron para obtener 1000 μL de una solución 2X. Para la tinción, el medio se reemplazó con 250 μL de la dilución 1X de esta solución, manteniendo los platos de cultivo dentro de una cabina de flujo laminar durante 15 min. Los soportes y la membrana de policarbonato se separaron de las paredes del inserto y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

Para el análisis histológico, los cultivos 3D-HCAEC se fijaron con PFA al 4% por 24 h, se lavaron con PBS, se desprendieron de la membrana de policarbonato del inserto y se trataron siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.5. Después de cortarlos transversalmente con un micrótopo rotatorio a un grosor de 5 μm , se tiñeron con HE y se observaron con un microscopio de luz. Las imágenes de los cortes se capturaron con una cámara digital (Nikon) acoplada al microscopio de luz.

Para el análisis SEM, los cultivos 3D-HCAEC se fijaron con Glutaraldehído 4% por 48 h y se lavaron con PBS. Después de deshidratarlos en concentraciones ascendentes de

alcohol etílico (70, 80, 90 y 100 % v/v; en agua desionizada), las muestras se secaron utilizando un sistema de secado de punto crítico y se recubrieron con oro por el método de pulverización catódica.

4.3.3.2 Identificación de F-actina y núcleos en el cultivo 3D-HCAEC

Se fijaron cultivos 3D, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Glicina 0.2M por 10 min, se volvieron a lavar con PBS, se incubaron con Triton X-100 al 0.2% por 10 min y se bloquearon con Suero de Cabra al 4% y Albúmina al 1% durante 1 h. El reactivo Faloidina de Rodamina se solubilizó con Albúmina al 1%, se colocó en los cultivos y transcurridos 20 min se adicionaron 2 gotas de medio de montaje con DAPI. Para observar las monocapas celulares formadas sobre los soportes, estos se separaron del inserto y se observaron con microscopía de fluorescencia.

4.3.3.3 Evaluación de la permeabilidad del cultivo 3D-HCAEC

La formación de la barrera endotelial se evaluó siguiendo un procedimiento descrito (Martins-Green, Petreaca, & Yao. 2008). En la cámara apical de cultivos de 1, 3, 5 y 7 días se agregó una solución (10 µg/mL) de FITC Dextrano y se midió el tiempo requerido por esta solución para pasar a la cámara basolateral de los pozos. En cada ensayo, se incluyeron insertos sin soportes y cultivos 3D-HCEAC tratados con EDTA 5mM como controles. A diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 18 y 24 h) se tomaron alícuotas (10 µL) del medio de la cámara basolateral y se diluyeron con 90 µL de agua desionizada en una placa de 96 pozos. En un lector de microplacas con excitación a 485 nm y emisión a 535 nm se midió la intensidad de fluorescencia en el momento en que se tomó cada muestra y luego de transcurridas 24 h.

4.4 Cultivo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Para obtener los cultivos de *A. actinomycetemcomitans* cepa ATCC 29522 serotipo b, se siguió el procedimiento estandarizado por el Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque. Con tal fin, se descongeló y sembró *A. actinomycetemcomitans* en agar BHI y se cultivó en microaerofilia por (72 h, 37 °C, 5%, CO₂). Para obtener los inóculos y calcular la multiplicidad de infección (MOI), se resuspendieron colonias en medio EGM-2V

hasta obtener una suspensión con una densidad óptica de 0.360 (λ : 620 nm). Después, 1 mL de esta suspensión se sembró en superficie en agar BHI, se incubó (72 h, 37 °C, 5% CO₂), se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y se prepararon los inóculos (MOI= 1:100; 1:10 y 1:1) utilizados en los ensayos de infección de los cultivos 3D-HCAEC.

4.4.1 Ensayos de infección

Se infectaron cultivos 3D-HCAEC con diferentes MOI (1:100, 1:10 y 1:1) de *A. actinomycetemcomitans* cepa ATCC 29522 serotipo b, se incubaron (usando condiciones descritas por Gualtero, Lafaurie, & Fontanilla, 2019), se recolectó el medio de cultivo de la cámara apical y basolateral del inserto, se centrifugó (12.000 rpm; 4 °C por 10 min) y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C. En todos los ensayos se incluyeron cultivos 3D-HCAEC con LPS de *A. actinomycetemcomitans* -LPS-Aa- (1 µg/mL) y cultivos 3D-HCAEC no infectados, como controles. La viabilidad celular se evaluó con el Kit LIVE/DEAD e histológicamente. Los ensayos de infección se realizaron por triplicado.

4.4.2 Ensayo de adhesión de monocitos THP-1

Los ensayos de adhesión de monocitos THP-1 a cultivos 3D-HCAEC se hicieron siguiendo procedimientos descritos (Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2019). Se estimuló una suspensión celular de monocitos THP-1 de 2×10^5 células/mL con LPS-Aa (1 µg/mL) por 30 min y se marcó con calceína AM (10 µM) por 1 h (37 °C, 5% CO₂). La suspensión de monocitos marcados se agregó a los cultivos 3D-HCAEC infectados previamente (MOI 1:1; 1:10; 1:100) y se incubó (37 °C, 5% CO₂) por 2 h. Terminada la incubación, los cultivos se lavaron con PBS en un lavador de placas por 5 min y se leyó la intensidad de fluorescencia a 485/535 nm. En todos los ensayos se incluyeron cultivos 3D-HCAEC con LPS de *A. actinomycetemcomitans* -LPS-Aa- (1 µg/mL) y cultivos 3D-HCAEC no infectados, como controles. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4.3 Ensayo de migración de monocitos THP-1

Para este ensayo se empleó el Kit CytoSelect™ siguiendo las indicaciones del fabricante. Inicialmente, se preparó una suspensión celular de monocitos THP-1 en medio RPMI libre de suero (5×10^6 células/mL), se le adicionó LPS-Aa ($1 \mu\text{g/mL}$) y se incubó por 30 min. Después, en cada pozo de una microplaca (feeder tray) se agregó RPMI con SFB al 10% ($150 \mu\text{L}$). La bandeja alimentadora (feeder tray) se cubrió y acopló con otra microplaca (membrana migratoria) que contenía $100 \mu\text{L}$ pozo de los sobrenadantes de los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* (MOI 1:1; 1:10; 1:100), los cultivos 3D-HCAEC estimulados con LPS-Aa, y los medios de los cultivos empleados como controles (cultivos 3D-HCAEC no infectados e incubados con LPS-Aa). En cada pozo de la membrana migratoria se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de la suspensión celular de monocitos THP-1 y se incubó por 24 h (37°C , 5% CO_2). Finalizada la incubación, en cada pozo de la membrana migratoria se agregaron $150 \mu\text{L}$ de la solución de separación celular y se incubó por 30 min (37°C , 5% CO_2). Luego, la suspensión celular de cada pozo de la membrana migratoria se reemplazó por $150 \mu\text{L}$ de la solución de separación celular y se retiró la membrana migratoria. En una microplaca oscura de 96 pozos se mezclaron $75 \mu\text{L}$ de la solución de separación con $75 \mu\text{L}$ del medio colocado en el feeder tray y $50 \mu\text{L}$ de buffer de lisis/CyQuant® GR Dye por pozo y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente, la intensidad de fluorescencia de cada pozo se midió a 480 nm / 520 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.4.4 Cuantificación de citocinas proinflamatorias

Mediante citometría de flujo se cuantificaron los niveles de citocinas en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos 3D-HCAEC incubados con *A. actinomycetemcomitans*, empleando el kit Human Inflammation Panel (8-Plex) compuesto por: CCL5 (RANTES), MCP-1, MIP-1 IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (LEGEND-Plex®). Los compuestos cuantificados fueron CCL5 (RANTES), MCP-1, MIP-1 IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6. Los resultados fueron analizados con el software LEGENDplex v8.0 (Vigene Tech, USA), siguiendo protocolos estandarizados por el Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque. Los niveles de citocinas fueron expresados en pg/mL y las cuantificaciones se realizaron por triplicado.

4.4.5 Determinación del Factor de Crecimiento Transformante Beta 1 (TGF- β 1).

La cuantificación de TGF- β 1 en los sobrenadantes de los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* se hizo con el kit Quantikine[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las mediciones se hicieron en un lector de microplacas a 450 nm. Los niveles de TGF- β 1 fueron expresados en pg/mL. Las cuantificaciones se hicieron por triplicado.

4.5 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media. Se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba post-hoc de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. En este análisis se empleó el programa estadístico STATA[®] 16 (StataCorp, USA). Las gráficas fueron realizadas en el programa GraphPad[®] Prim 8 (2020, USA) y las imágenes fueron tratadas con GIMP 2.10[®] (2020, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Elaboración de los soportes de colágeno Tipo I

Esta tesis optimizó la elaboración de soportes de colágeno tipo I sobre la membrana de policarbonato de la cámara apical de insertos Transwell™. El propósito de esta optimización fue producir soportes con bordes adheridos a la cara interna de las paredes de los insertos. En el proceso se emplearon diferentes concentraciones de colágeno (5, 8, 10 mg/g dispersión). También, se evaluaron diferentes pesos de las dispersiones a servir en los insertos, debido a que por su viscosidad no se pudo servir un volumen constante de las mismas. Otros parámetros tenidos en cuenta fueron la temperatura de congelación y el tiempo de liofilización. La apariencia de los soportes de colágeno tipo I producidos en Transwell de 24 y 12 mm de diámetro, sugiere la formación de soportes porosos en los dos tipos de insertos (**Figura 6**).

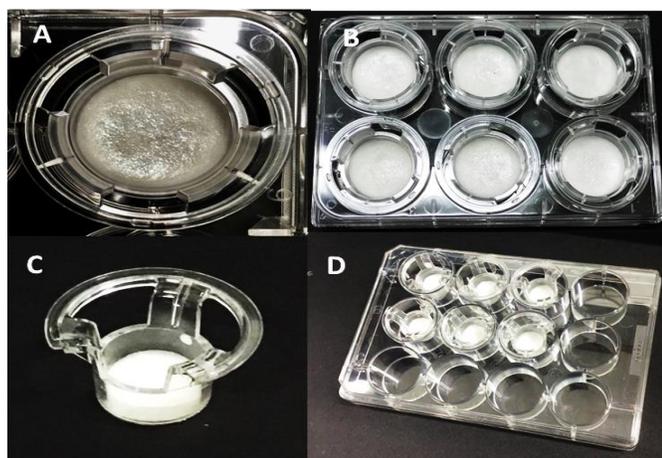


Figura 6. Apariencia de los soportes de colágeno tipo I (10 mg/g), elaborados sobre la cara apical de los insertos Transwell™ de 24 y 12 mm. A) Vista superior del inserto de 24 mm. B) Sistema inserto-soporte en caja de 6 pozos. C) Vista lateral del inserto de 12 mm. D) Sistema inserto-soporte en caja de 12 pozos.

Con un estereoscopio se evaluó la superficie de los soportes elaborados sobre la cara apical de la membrana del inserto empleando las diferentes concentraciones evaluadas (**Figura 7**). Imágenes representativas de este análisis demuestran que los bordes de los soportes

de 5 y 8 mg/g de colágeno tipo I se separaron de las paredes de los insertos (**Figura 7 A, B**), por el contrario, los bordes de los soportes de 10 mg/g de colágeno se observaron adheridos al inserto (**Figura 7 C**).

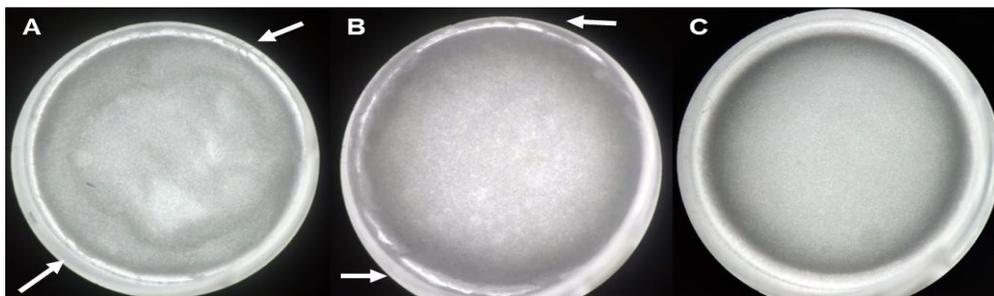


Figura 7. Observación estereoscópica de los soportes de colágeno tipo I, elaborados sobre la cara apical de insertos Transwell™. Las imágenes corresponden a una vista superior del sistema inserto-soporte con las concentraciones: A) Colágeno 5 mg/g. B) Colágeno 8 mg/g. C) Colágeno 10 mg/g. Las flechas blancas indican desprendimientos.

5.1.1 Análisis de los soportes con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

El sistema inserto-soporte fue evaluado por SEM. Las micrografías de baja resolución confirmaron lo observado cuando los soportes se analizaron con el estereoscopio: los soportes elaborados con las dispersiones de 5 y 8 mg/g se retrajeron (**Figura 8 A, B**), mientras que los elaborados con 10 mg/g se mantuvieron adheridos a las paredes internas del inserto (**Figura 8 C**).

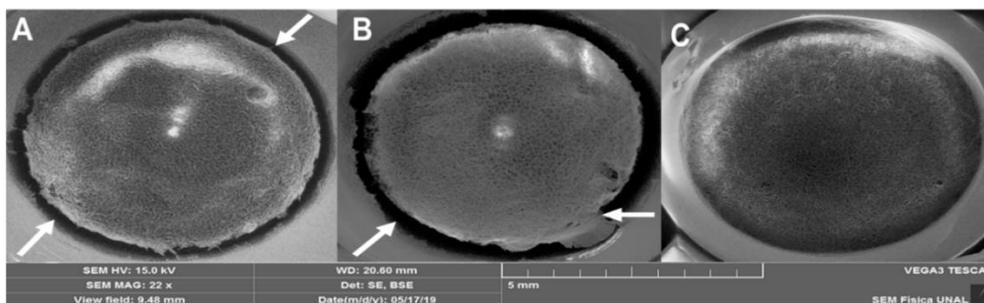


Figura 8. Análisis SEM. Las imágenes representan una vista panorámica del sistema inserto-soporte a las diferentes concentraciones de colágeno empleadas. A) 5 mg/g. B) 8 mg/g. C) 10 mg/g. Las flechas blancas indican desprendimientos Escala 5 mm.

Las micrografías de alta resolución confirmaron lo descrito anteriormente (**Figura 9**). Los bordes de los soportes de 5 mg/g se rompieron (**Figura 9 A**) además de desprenderse del inserto (**Figura 9 B**). Lo mismo ocurrió con los soportes de 8 mg/g (**Figura 9 C, D**). Sin embargo, los soportes de 10 mg/g se mantuvieron adheridos a las paredes del inserto (**Figura 9 E, F**).

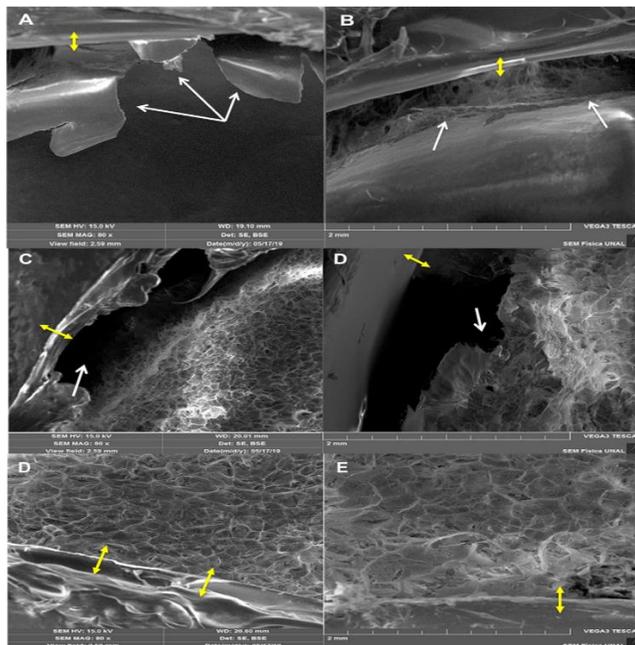


Figura 9. Análisis SEM de los soportes de colágeno tipo I del sistema inserto-soporte. Micrografías de soportes de 5 mg/g: A) Zona de desprendimiento del soporte. B) Zona de retracción del soporte. Micrografías de soportes de 8 mg/g: C) y D) Zonas de retracción del soporte. Micrografías de soportes de 10 mg/g: D) y E) Adhesión del soporte a las paredes internas del inserto Transwell™. Las dobles flechas amarillas señalan la pared del inserto. Las flechas blancas indican los desprendimientos Escala 2 mm.

5.1.2 Determinación del tamaño de poro

La **Figura 10** muestra micrografías representativas de las imágenes SEM utilizadas para evaluar el tamaño de poro de los soportes obtenidos con las tres concentraciones evaluadas. En todos los casos se observan poros definidos e interconectados, de diferentes tamaños. Aparentemente los poros de los soportes de 5 y 8 mg/g son más grandes (**Figura 10 A, B**) que los de los soportes de 10 mg/g (**Figura 10 C**).

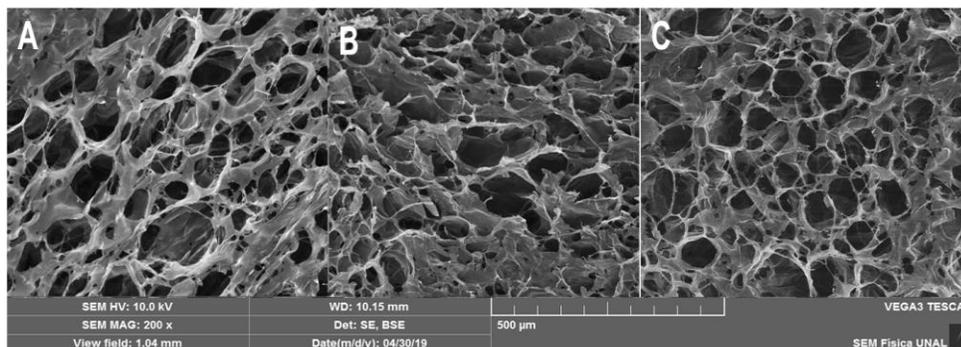


Figura 10. Análisis SEM de los soportes de colágeno tipo I. Las micrografías muestran cortes longitudinales de los soportes de colágeno tipo I a las tres concentraciones evaluadas A) 5 mg/g. B) 8 mg/g. C) 10 mg/g. Escala 500 μm .

Las mediciones de los ejes mayores y menores de los poros se usaron para calcular el tamaño de poro; los valores de tamaño de poro obtenidos indican que en los soportes evaluados no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos, a pesar de que el tamaño de poro disminuyó a medida que aumento la concentración de colágeno (**Tabla 4**).

Tabla 4. Tamaño de poro para las concentraciones de colágeno de 5, 8 y 10 mg/g. Mediciones realizadas por triplicado en el programa ImageJ.

Concentración de colágeno tipo I (mg/g)	Promedio eje mayor (μm)	Promedio eje menor (μm)	Número de poros contado	Desviación estándar	Tamaño de poro (μm)	P > 0.05
5	73,3	56,7	50	71.52	198	0.522
8	68,6	52.8	50	56.87	183	0.234
10	64,5	50.1	50	73.31	176	0.848

5.1.3 Porcentaje de porosidad

La **Figura 11** muestra los resultados de las determinaciones del porcentaje de porosidad de los soportes. La disminución de la porosidad cuando aumenta la concentración fue evidente; los soportes elaborados con 5 mg/g de colágeno tuvieron mayor porosidad (98.1 %) que los soportes de 8 mg/g (95.2 %) y que los soportes de 10 mg/g (91.9 %). Las diferencias de porosidad fueron significativas ($p < 0.05$).

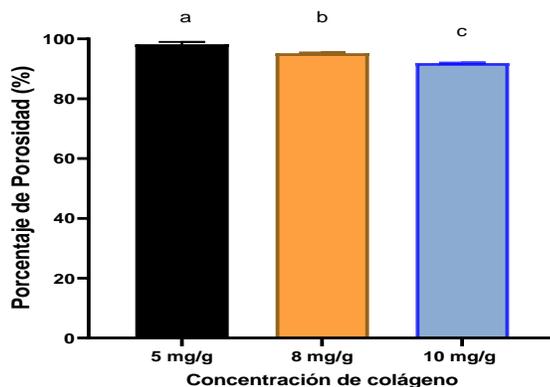


Figura 11. Análisis de la porosidad. Se muestra el porcentaje de porosidad de los soportes de colágeno tipo I elaborados a las concentraciones de colágeno evaluadas: 5, 8 y 10 mg/g. Mediciones realizadas por triplicado. Se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones ($p < 0.05$) ($a=0.0035$, $b=0.000047$, $c=0.0019$).

5.2 Caracterización fisicoquímica de soportes de colágeno tipo I

5.2.1 Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de todos los soportes de colágeno analizados mostraron los picos de absorción característicos del colágeno tipo I: (1) amida A (estiramiento enlace N-H) en 3298 cm^{-1} ; (2) amida B (vibración enlace N-H) en 3078 cm^{-1} ; (3) amida I (vibración enlace C-O) en 1631 cm^{-1} ; (4) amida II (vibración enlace C-N) en 1548 cm^{-1} y (5) amida III (estiramiento C-N, doblamiento N-H y estiramiento C-C) en 1245 cm^{-1} (**Figura 12**).

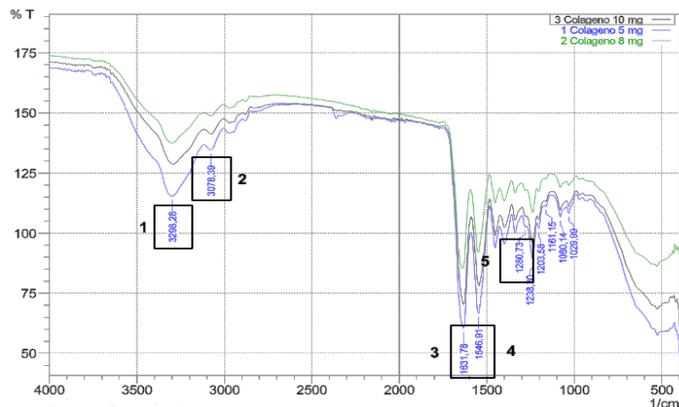


Figura 12. Análisis FTIR. La gráfica representa el porcentaje de transmitancia de los espectros obtenidos con soportes a las tres concentraciones evaluadas: 5 mg/g (azul), 8 mg/g (verde) y 10 mg/g (negro).

5.2.2 Porcentaje de hinchamiento

Este ensayo mostró que el hinchamiento en PBS de los soportes de 5 mg/g de colágeno fue diferente al de los soportes de 8 y 10 mg/g (**Figura 13**). El porcentaje de hinchamiento de los primeros disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en función del tiempo; por el contrario, no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre los otros dos soportes, los porcentajes fueron menores que los de los soportes de 5 mg/g y no variaron en el tiempo ($p > 0.05$).

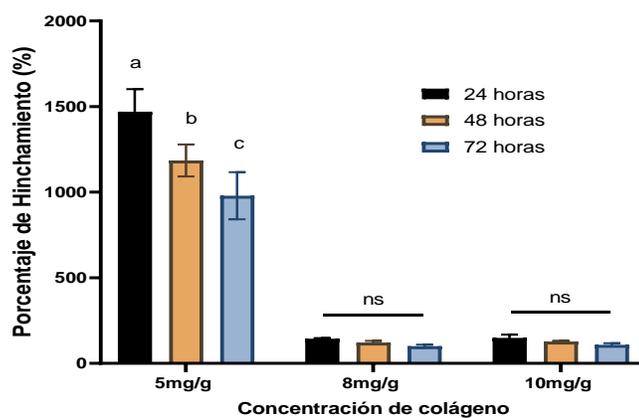


Figura 13. Porcentaje de hinchamiento. La gráfica muestra el porcentaje de hinchamiento de los soportes elaborados con las concentraciones de colágeno utilizadas y las mediciones realizadas a las 24, 48 y 72 h mediante el método de desplazamiento de líquido modificado. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$): (a=0.0015, b=0.00019, c=0.025). ns: no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$).

5.2.3 Evaluación histológica de los soportes de colágeno tipo I

La **Figura 14** muestra la evaluación histológica de los cortes de los soportes. Se puede apreciar que los elaborados con la concentración más baja de colágeno (5 mg/g) no mantuvieron su estructura durante el procesamiento (**Figura 14 A**), mientras que los soportes de 8 y 10 mg/g de colágeno sí lo hicieron. En estos últimos, se pudo observar fibras de colágeno formando poros (flechas negras), algunos interconectados (flechas blancas) (**Figura 14 B y C**).

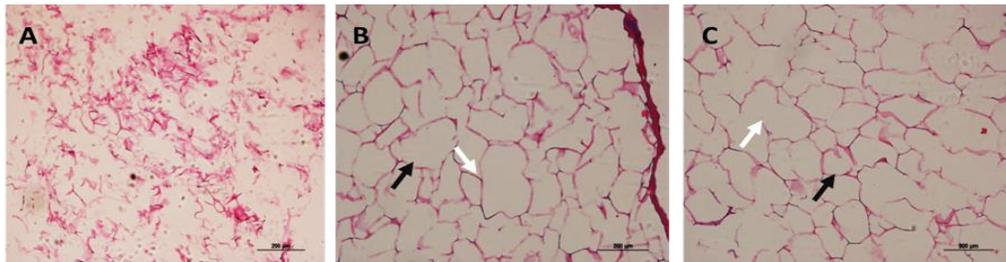


Figura 14. Análisis histológico. Se muestran micrografías representativas de cortes longitudinales de los soportes a las tres concentraciones de colágeno utilizadas. A) 5 mg/g. B) 8 mg/g. C) 10 mg/g. Escala 200 µm. Se evidencian poros -flechas negras- e interconectividad entre ellos -flechas blancas-.

5.3 Caracterización del cultivo celular 3D-HCAEC

Los resultados obtenidos en la evaluación microestructural y fisicoquímica descrita anteriormente se tuvieron en cuenta para escoger los soportes a utilizar en los ensayos de infección. En estos experimentos las células HCAEC se cultivaron solamente en los soportes producidos con una dispersión de colágeno de 10 mg/g, porque fueron los únicos cuyos bordes se mantuvieron adheridos a las paredes de los insertos. Inicialmente, se hicieron observaciones en baja y alta resolución de cultivos sin infectar después de 7 días de incubación (**Figura 15**). Claramente, las HCAEC se distribuyeron en toda la superficie del soporte (**Figura 15 A**) y formaron uniones estrechas entre ellas (**Figura 15 B**).

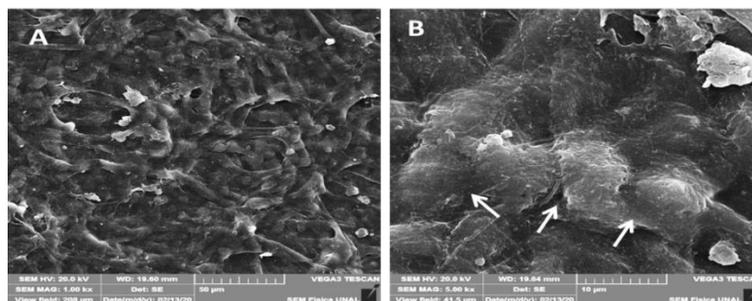


Figura 15. Análisis SEM del cultivo 3D-HCAEC. Micrografías tomadas en cultivos incubados durante 7 días. A) Baja magnificación, la barra corresponde a 50 µm. B) Alta magnificación, la barra corresponde a 10 µm. Flechas: unión intercelular.

La viabilidad de las HCAEC sembradas en los soportes se evaluó con el Kit LIVE/DEAD (**Figura 16**). La observación con microscopía de fluorescencia de cultivos de 1, 3, 5 y 7 días mostró la presencia de células vivas (color verde) y células muertas (color rojo).

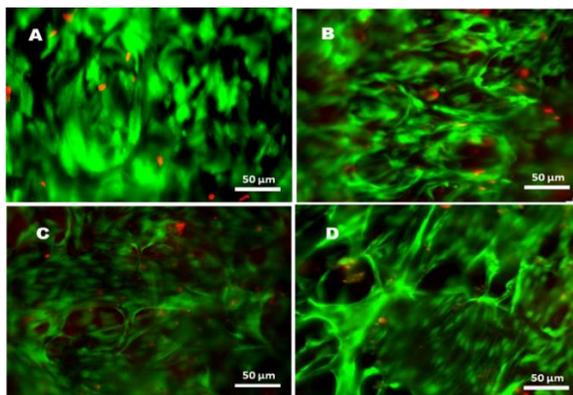


Figura 16. Viabilidad celular con la tinción LIVE/DEAD® en cultivos 3D-HCAEC. Micrografías de los días de cultivo: A) 1 día. B) 3 día. C) 5 día. D) 7 día. Los cultivos fueron teñidos con el Kit LIVE/DEAD. La barra en las imágenes corresponde a una Escala de 50 µm.

5.3.1 Análisis histológico de los cultivos 3D-HCAEC.

Con el fin de evaluar la formación de monocapa endotelial en los soportes elaborados sobre la cara apical de los insertos, se tiñeron con HE cortes transversales de cultivos 3D-HCAEC incubados por 7 días (**Figura 17**). Se encontró que las HCAEC forman una capa sobre la superficie apical de los soportes de colágeno desde el primer día de cultivo (**Figura 17 A**). Aunque en algunos de los cortes de los cultivos de 3 y 5 días, la monocapa se ve desprendida de las fibras de colágeno (**Figura 17 B, C**) fue posible observar células unidas estrechamente entre sí y al soporte a los 7 días de cultivo (**Figura 17 D**).

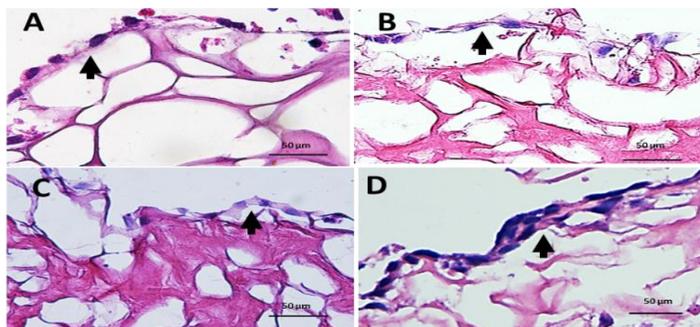


Figura 17. Análisis histológico de cultivos 3D-HCAEC. Las imágenes representativas de cortes transversales de los cultivos. A) 1 día. B) 3 día. C) 5 día. D) 7 día. Tinción empleada HE. Flechas negras: HCAEC. Barra de las imágenes 50 µm.

5.3.2 Permeabilidad del cultivo 3D-HCAEC

Se realizó un ensayo de permeabilidad con FITC-Dextrano durante 24 h, para evaluar la formación de barrera en las HCAEC sembradas sobre los soportes y cultivadas por 1, 3, 5 y 7 días (**Figura 18**). Los datos indican que no hubo diferencia ($p > 0.05$) significativa en la permeabilidad del trazador entre los cultivos 3D-HCAEC. Sin embargo, durante el tiempo del ensayo estos valores fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los obtenidos con los cultivos tratados con EDTA y con el inserto sin soporte y sin células (usados como control negativo de la formación barrera). Lo cual, sugiere efecto de barrera de las células desde el primer día de cultivo. También, se observó que después de 18 h de iniciado el ensayo no hubo variaciones en la permeabilidad del trazador en ninguno de los cultivos 3D-HCAEC; por el contrario, en los controles si se observaron diferencias entre la permeabilidad a las 18 y 24 h.

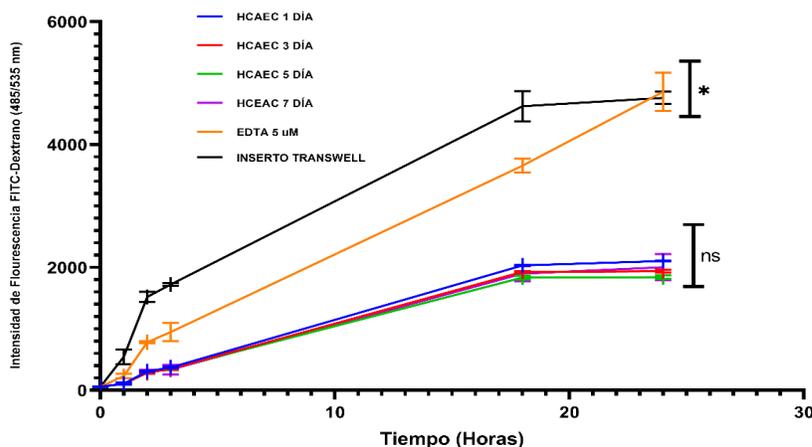


Figura 18. Ensayo de permeabilidad usando FITC Dextrano. Cultivos 3D-HCAEC sembrados en la cara apical de insertos Transwell™. Se realizaron ensayos por triplicado y el promedio fue graficado para cada uno de los tiempos evaluados. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). (* $p = 0.0000$ para las 18h y $p = 0.0000$ para las 24 h). ns: no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

5.3.3 Microscopía de fluorescencia del cultivo 3D-HCAEC

Se hicieron observaciones con microscopía de fluorescencia de las fibras de actina y de los núcleos celulares en cultivos 3D-HCAEC de 3, 5 y 7 días. Las células teñidos con DAPI, rodamina y las sobreposiciones de estos se muestran en la **Figura 19**. Todos los cultivos

fueron positivos para DAPI y F-actina; además, las dos tinciones se colocalizaron. Aunque no se contaron los núcleos, aparentemente, estos aumentaron al aumentar el tiempo de cultivo.

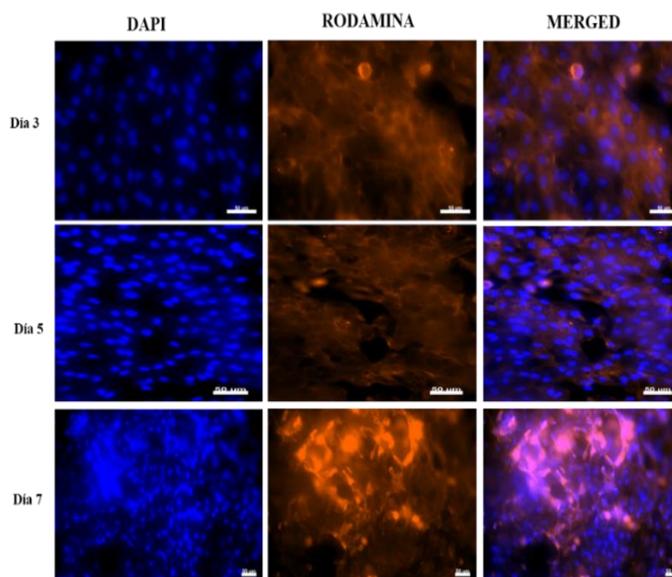


Figura 19. Microscopía de fluorescencia del cultivo 3D-HCAEC a los 3,5 y 7 días de cultivo. Se observan núcleos celulares y co-localización de núcleos con F-actina. La barra en las imágenes corresponde a una Escala de 50 μm .

5.4 Infección de los cultivos 3D-HCAEC con *A. actinomycetemcomitans* cepa ATCC 29522

Con el fin de evaluar la viabilidad de las células, se inmunotñieron con el kit LIVE/DEAD los cultivos 3D-HCAEC incubados durante 7 días e infectados con diferentes MOI (1:100; 1:10) de *A. actinomycetemcomitans* (**Figura 20**). Aparentemente, en el cultivo sin infectar se observaron menos células muertas (**Figura 20 A**) que en los cultivos infectados con MOI 1:100 (**Figura 20 B**) y MOI 1:10 (**Figura 20 C**) del periodontopatógeno. En los cultivos 3D-HCAEC tratados con LPS Aa también se ven menos células muertas que en los infectados (**Figura 19 D**).

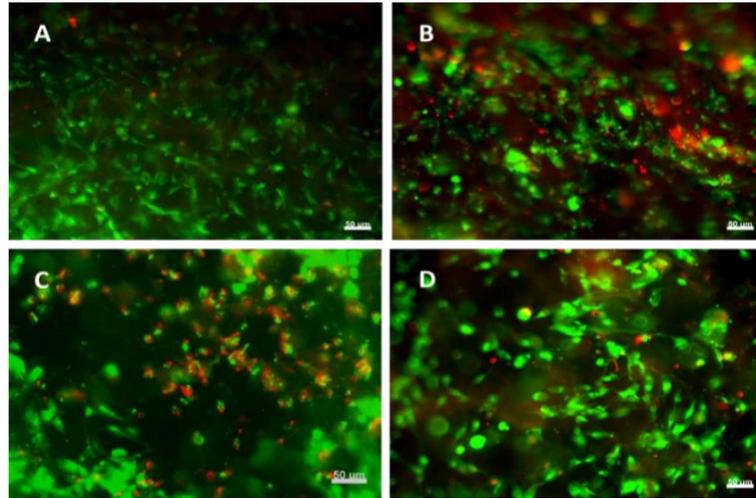


Figura 20. Viabilidad celular con la tinción LIVE/DEAD en cultivos 3D-HCAEC postinfección. A) Control negativo. B) MOI 1:100. C) MOI 1:10. D) LPS Aa a una concentración de 1 µg/mL. La barra representa una Escala de 50 µm en todas las imágenes.

Con el fin de evaluar si la infección afectaba la formación de monocapas celulares sobre los soportes de colágeno I, se hicieron cortes transversales de cultivos 3D-HCAEC infectados con una MOI (1:100) y se tiñeron con HE (**Figura 21**). La evaluación histológica evidenció la presencia de células endoteliales en la superficie (borde superior) del cultivo (**Figura 21 A**). Se tiñó uno de los cortes con tinción de Gram y se observó con mayor resolución, comprobándose la presencia de células unidas estrechamente en la superficie del soporte y (**Figura 21 B**). En las dos figuras se observan bacterias y discontinuidades en la capa celular.

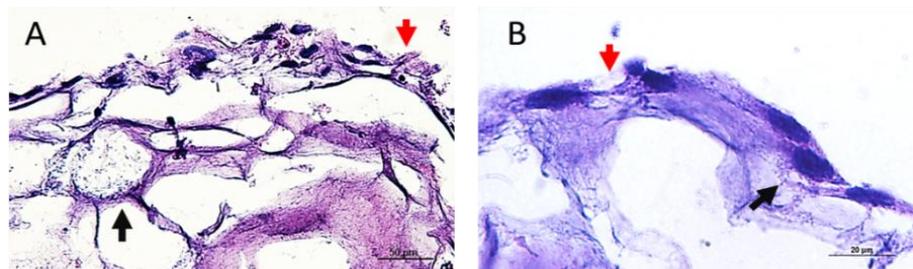


Figura 21. Análisis histológico de cultivos 3D-HCAEC postinfección (MOI 1:100). Se muestran imágenes representativas de cortes transversales de los cultivos. Flechas rojas: Disrupción de las HCAEC. Flechas negras: *A. actinomycetemcomitans*. A) Barra de la imagen 50 µm que corresponde a objetivo de 40x. B) Barra de la imagen 20 µm que corresponde a objetivo de 100x.

Los cultivos 3D-HCAEC infectados *A. actinomycetemcomitans* también fueron evaluados con microscopía electrónica de barrido (SEM), evidenciándose la presencia de bacterias adheridas a la membrana de las HCAEC (**Figura 22**).

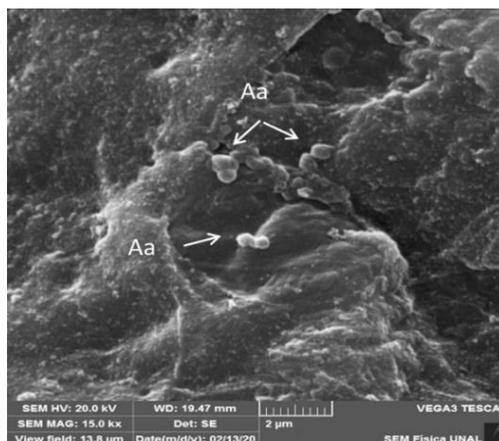


Figura 22. Análisis SEM del cultivo 3D-HCAEC infectado con *A. actinomycetemcomitans* (MOI 1:100). Micrografías tomadas del día 7 de cultivo celular. La barra corresponde a 2 μm las flechas blancas señalan a la bacteria.

5.4.1 Adhesión de monocitos en cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans*

Se realizó un ensayo para evaluar si la infección con *A. actinomycetemcomitans* promueve la adhesión de monocitos THP-1 a las células de los cultivos 3D-HCAEC (**Figura 23**). Los datos muestran que la adhesión de monocitos aumentó con la multiplicidad de infección y fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los cultivos infectados con las MOI más altas (1:10, 1:100) que en los cultivos infectados con la MOI más baja (1:1), los cultivos tratados con LPS Aa y los cultivos no infectados (control). Además, aunque no se observó diferencia en la adhesión de monocitos entre los cultivos 3D-HCAEC infectados con MOI 1:1 y los cultivos incubados con LPS Aa la adhesión de monocitos fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en estos que en los cultivos control.

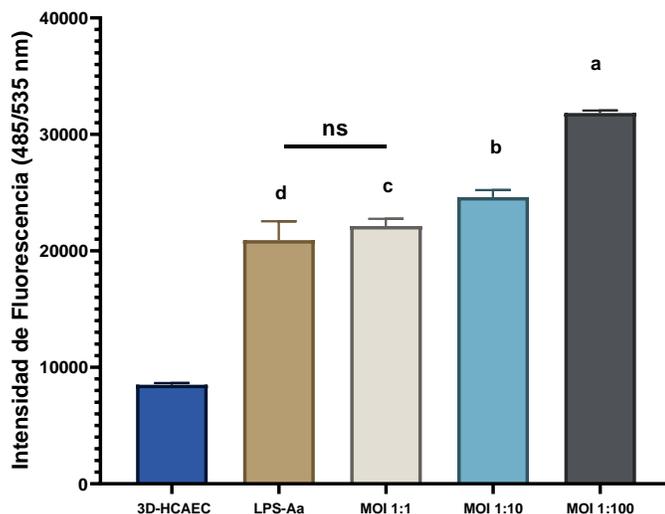


Figura 23. Adhesión de monocitos THP-1 a cultivo 3D-HCAEC infectado con *A. actinomycetemcomitans*. La línea de monocitos fue marcada con calceína AM y luego inoculada en un cultivo infectado. La gráfica permite mostrar las diferencias significativas con el control ($p < 0.05$), $a = 0.0000$, $b = 0.0000$, $c = 0.0000$, $d = 0.0000$. Entre la infección a MOI 1:1 y LPS Aa no se observó diferencia significativa, ns: ($p > 0.05$). Los datos representan la media de experimentos realizados por triplicado.

5.4.2 Migración de monocitos inducida por los sobrenadantes de los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans*

Se quiso determinar si los medios de cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* quimioatraían a los monocitos THP-1. Los resultados mostrados en la **Figura 24** indican que entre el control (3D-HCAEC sin infectar) y los cultivos infectados (MOI 1:1; 1:10; 1:100) hubo diferencias significativas en la migración ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos tratados con LPS-Aa y MOI 1:1 ($p > 0.05$).

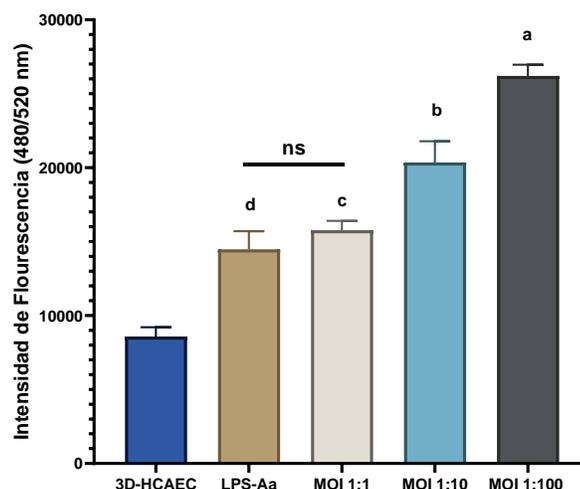


Figura 24. Evaluación de la migración de monocitos THP-1 en los sobrenadantes de los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans*. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control 3D y las diferentes MOI empleadas: $a = 0.0000$, $b = 0.0000039$, $c = 0.00036$, $d = 0.0000$. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre LPS Aa y el cultivo 3DHCAEC infectado a MOI 1:1, ns: ($p > 0.05$). Los datos representan la media, experimentos realizados por triplicado.

5.4.3 Cuantificación de citocinas proinflamatorias secretadas en 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans*

En el medio de los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* se cuantificaron citocinas quimiotácticas y proinflamatorias secretadas. Los resultados del ensayo son presentados en la **Figura 25**. Para la cuantificación, se mezclaron los medios provenientes de las cámaras apical y basolateral y se usaron como control los medios de cultivos no infectados. Solamente se pudo detectar IL-6 obtenida (1.770 pg/mL) en los medios de los cultivos infectados con la MOI más alta (1:100). En los cultivos infectados con MOI menores (1:10; 1:1), tratados con LPS-Aa y control se encontraron concentraciones menores a 5.86 pg/mL y no hubo diferencias significativas entre ellas (**Figura 25A**). Las concentraciones de MCP-1 detectadas en los medios de los cultivos infectados fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las encontradas en los cultivos tratados con LPS-Aa y variaron en función de la MOI. Además, las concentraciones detectadas en los cultivos infectados y en los tratados con LPS Aa fueron significativamente mayores que las concentraciones de IL-6 en los medios de los cultivos control (**Figura 25**

B). La cuantificación mostró variaciones significativas ($p < 0.05$) en la concentración de IL-8 en función de la MOI empleada, así como, entre los cultivos infectados y los cultivos incubados con LPS-Aa y control (**Figura 25 C**). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos tratados con LPS Aa y los controles ($p > 0.05$).

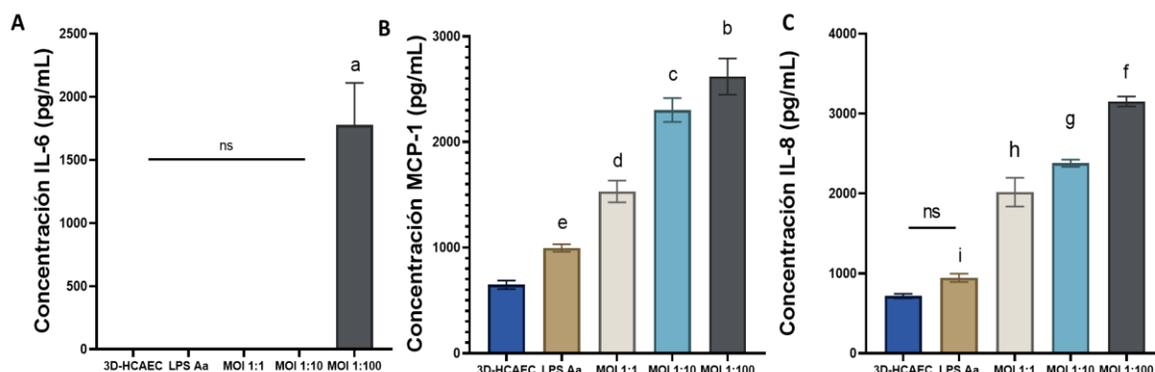


Figura 25. Cuantificación de citocinas. Citocinas detectadas en los sobrenadantes de cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans*. A) Concentración de IL-6 (pg/mL) detectada. Diferencias significativas: (a=0.000017), respecto al control. B) Concentración de MCP-1 pg/mL detectada. Diferencias significativas entre los MOI utilizados y el control: (b=0.0000, c=0, d=0.000094, e=0.015). C) Concentración de IL-8 pg/mL detectada. Diferencias significativas entre los MOI empleados con respecto al control: (f=0, g=0.000013, h=0.000094-8). Nivel de significancia de $p < 0.05$. No se observaron diferencias significativas entre el control y LPS Aa, ns: ($p > 0.05$), pero sí, entre los demás tratamientos con respecto a LPS Aa (i=0.000083). Los datos representan la media de dos experimentos realizados por triplicado.

5.4.4 Cuantificación de TGF- β 1 en los medios de los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans*

En los medios de cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* se cuantificó TGF- β 1 marcador asociado con la transición endotelial-mesénquimal ampliamente descrita en aterosclerosis. Los resultados indican que las concentraciones encontradas en los medios de los cultivos infectados con la MOI más alta (1:100) fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la concentración hallada en el medio de los controles y los cultivos infectados con las otras MOI o incubados con LPS-Aa. Además, aunque la concentración de TGF- β 1 en estos últimos cultivos no fue diferente ($p > 0.05$) si fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la encontrada en el medio de los cultivos control (**Figura 26**).

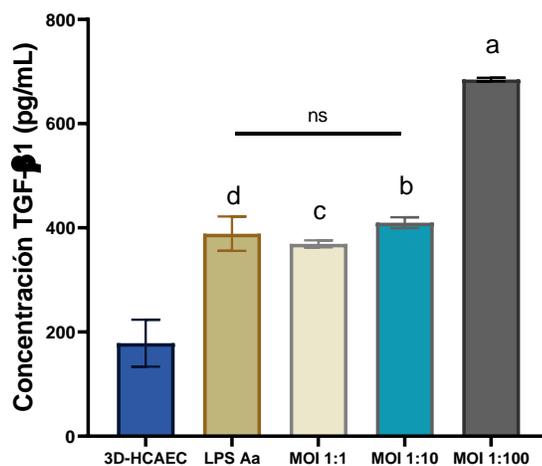


Figura 26. Cuantificación de TGF-β1 en los sobrenadantes de cultivos 3D-HCEAC infectados con *A. actinomycetemcomitans*. Se observaron diferencias significativas entre los MOI utilizados con respecto al control: (a=0.0000, b=0.000048, c=0.00028, d=0.000016). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos LPS Aa, MOI 1:10 y MOI 1:1 (ns: p>0.05). Los datos representan la media de cada grupo de los experimentos realizados por triplicado.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvieron soportes de colágeno tipo I sobre la cara apical de insertos Transwell™ -completamente adheridos a las paredes del inserto- liofilizando una dispersión de colágeno de 10 mg/g. Al usar la mayor de las tres concentraciones evaluadas para preparar los soportes, el grosor de la pared de los poros del soporte aumentó contribuyendo a que después de la liofilización la contracción de los soportes disminuyera con respecto a las otras dos concentraciones (Offeddu, *et al.*, 2015; Offeddu, *et al.*, 2016). En el modelo 3D optimizado la porosidad de los soportes disminuyó significativamente al aumentar la concentración de colágeno. Este resultado soporta la idea de que liofilizando la dispersión más concentrada de colágeno se obtienen soportes con microestructura estable a la contracción, ya que al disminuir la porosidad y aumentar el grosor de las paredes el espacio vacío disminuye (Offeddu, *et al.*, 2016).

Los soportes que se obtienen al liofilizar dispersiones de colágeno poseen poros con tamaños que varían en rangos amplios, los cuales, dependen de la concentración de colágeno empleada (Suesca, *et al.*, 2017). Las dimensiones (largo x ancho x alto) reportadas de células endoteliales aisladas de arteria iliaca son $13.2 \pm 4.1 \mu\text{m}$, $25.8 \pm 8.5 \mu\text{m}$ y $245.0 \pm 115.1 \mu\text{m}^2$ (Garipcan, *et al.*, 2010). En este trabajo al utilizar la dispersión de colágeno tipo I más concentrada (10 mg/g) para elaborar el sistema soporte- inserto Transwell™ se obtuvieron los poros más pequeños (176 ± 73). Este tamaño de poro es compatible con el crecimiento de las HCAEC en la superficie del soporte y la formación de monocapa endotelial, en parte evidenciada por el análisis histológico de los cortes transversales de los cultivos 3D-HCAEC que muestra células endoteliales adheridas únicamente en la superficie del soporte.

La formación de barrera endotelial fue confirmada por el análisis SEM de los cultivos 3D-HCAEC mostrando una capa de células unidas entre sí recubriendo la superficie del soporte. También, por los ensayos de permeabilidad con FITC-Dextrano que mostraron diferencias significativas de permeabilidad entre los controles (insertos sin soportes de colágeno y cultivos 3D-HCAEC tratados con EDTA) y los cultivos 3D-HCAEC. La tinción LIVE/DEAD realizada en este trabajo demostró que la monocapa formada en los cultivos 3D-HCAEC incubados por 7 días está constituida mayoritariamente por células viables.

Estos resultados coinciden con los encontrados en trabajos previos del grupo (Gualtero, Lafaurie & Fontanilla, 2018; 2019) y otros (Petreaca *et al.*, 2007).

La adhesión de monocitos al endotelio activado y su migración al subendotelio, en donde se diferencian a células espumosas, son factores claves en la aterogénesis (Chistiakov, *et al.*, 2016; Islam, *et al.*, 2016). Nosotros demostramos que la adhesión de monocitos a los cultivos 3D-HCAEC y la migración de estas células, inducida por factores solubles secretadas por HCAEC, incrementa en función de la MOI de *A. actinomycetemcomitans* empleada en los ensayos de infección. Nuestros resultados sugieren que la infección por *A. actinomycetemcomitans* cepa ATCC 29522 serotipo b, juega un papel en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas al inducir la expresión de MCP-1, IL-6 e IL-8. Se ha informado que la secreción continua de estas citocinas degrada los componentes de la matriz extracelular y el fibrinógeno. Este factor y sus productos de degradación se han detectado en ateromas humanos (Davalos & Akassoglou, 2012; Schenkein & Loos, 2013). Al igual que muchas otras bacterias patógenas, *A. actinomycetemcomitans* cepa 29522 serotipo b secreta altas dosis de Leucotoxina que amplifican la respuesta inflamatoria del huésped al alterar las vías de señalización o al producir citocinas proinflamatorias. Las MOI y el tiempo (24 h) de infección utilizados en este trabajo aumentaron la expresión de citocinas moduladoras de la inflamación, lo que sugiere que, durante la bacteriemia, el endotelio expuesto durante períodos más prolongados a las bacterias infectantes puede resultar dañado. Se ha descrito que la apoptosis de células endoteliales *in vitro* es inducida por Leucotoxina (Dietmann *et al.*, 2013; Vega, Schober, Kim, Belinka y Kachlany, 2019). Otros estudios han reportado este fenómeno, pero en células endoteliales humanas infectadas con otros periodontopatógenos (*P. gingivalis* y *E. corrodens*), y en monocapas de células endoteliales formadas sobre la superficie de poliestireno de frascos de cultivo (Xu, *et al.*, 2018; Viáfara, *et al.*, 2018; Wu, *et al.*, 2019).

La migración y adhesión de monocitos al endotelio resulta en la activación del endotelio (Ohtani & Nishimura 2020). Esta tesis demostró *in vitro* que cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* secretan o aumentan la secreción de IL-6, MCP-1 e IL-8. Lo anterior sugiere que durante una bacteriemia esta bacteria induce la secreción o aumenta la secreción de las mismas citocinas. La expresión de IL-8 juega un papel

importante en la aterogénesis porque induce la quimiotaxis de monocitos al endotelio (Imai, *et al.*, 2016). La IL-6 también está asociada con procesos de adhesión de leucocitos y monocitos al endotelio en etapas tempranas de la aterosclerosis (Petreaca, *et al.*, 2007). La inducción de la expresión o el aumento de la expresión de estas citocinas puede contribuir *in vivo* al desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Kallio, *et al.*, 2013; Chistiakov, *et al.*, 2016).

Debido a que hay bacteriemias que se originan en la cavidad oral, los efectos inducidos en el endotelio por la infección con periodontopatógenos continúan siendo objeto de estudio. En monocapas HUVEC formadas sobre la superficie de frascos de cultivo se ha encontrado que la expresión del factor proinflamatorio MCP-1, un quimioatrayente de monocitos asociado al proceso aterogénico (Niu & Kolattukudy, 2009). La adhesión de los monocitos al endotelio activado y su posterior migración al subendotelio, donde se transforman en células espumosas, son factores clave en la aterogénesis (Moroni, Ammirati, Norata, Magnoni, & Camici, 2019). Los resultados de esta tesis constituyen la primera evidencia *in vitro* de que la infección con *A. actinomycetemcomitans* modula la secreción de MCP-1. Por lo tanto, este microorganismo tendría como mecanismo plausible la secreción y posterior adhesión al endotelio activo de monocitos u otras células alterando la función endotelial.

Las citocinas proinflamatorias secretadas por HCAEC y los factores de virulencia (LPS, Leucotoxina y colagenasas) pueden inducir la transición de las células endoteliales a células con morfología mesenquimal, en un proceso que se denomina transición endotelio-mesenquima (EndMT) (Pérez, *et al.*, 2017). La EndMT juega un papel importante en la morfogénesis del corazón y en la aterogénesis mesenquima (Kovacic, *et al.*, 2012). Se caracteriza porque las células pierden marcadores endoteliales vía señalización TGF- β 1 y TGF- β 2, (Abdulkareem, *et al.*, 2018) y cambian su fenotipo endotelial al fenotipo mesenquimal (e.g.:fibroblastos); lo cual, explica el hallazgo de fibroblastos en la placa aterosclerótica (Chen, *et al.*, 2015; Evrard, *et al.*, 2016). En los cultivos 3D-HCAEC infectados con *A. actinomycetemcomitans* se detectó la secreción de TGF- β 1, sugiriendo que la respuesta inflamatoria inducida por esta bacteria conlleva a cambios de tipo EndMT. Este hallazgo es importante y constituye el primer reporte experimental *in vitro* que sugiere que bacterias periodontopatógenas inducen EndMT estimulando la secreción de TGF- β 1. Otros investigadores han descrito que las células endoteliales cultivadas en geles de

colágeno y estimuladas con IL-6 exhiben EndMT al inducir la expresión del antígeno muscular liso alfa (α SMA) vía Akt/NFkB (Mahler, *et al.*, 2013; Echeverría, *et al.*, 2013; 2016).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans 29522 serotipo b, es una bacteria asociada a infecciones orales (locales) y cardiovasculares (sistémicas). Su ADN, así como el de *P. gingivalis*, se ha encontrado en muestras de placas subgingivales y ateroscleróticas de individuos con enfermedad periodontal y cardiovascular concomitante (Atarbashi-Moghadam, *et al.*, 2018). La especie *A. actinomycetemcomitans* pertenece al grupo de bacterias asociadas a endocarditis infecciosa HACEK (*Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter paraphrophilus*, *Cardiobacterium spp.*, *Eikenella corrodens* y *Kingella spp.*) lo que aumenta su prevalencia en lesiones cardíacas (Yew *et al.*, 2014). Los resultados de esta tesis indican la importancia de realizar experimentos adicionales para demostrar que la infección con *A. actinomycetemcomitans* induce estas transiciones *in vivo*, lo cual puede ayudar a explicar su patogenicidad. En conjunto, los resultados de la tesis aportan evidencia de que cuando *A. actinomycetemcomitans* infecta células endoteliales induce o aumenta la secreción de citocinas que favorecen la adhesión y migración de monocitos, así como, citocinas con el potencial de inducir transiciones endotelio-mesénquima, eventos inflamatorios claves en el desarrollo de la placa aterosclerótica.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

Se optimizó y caracterizó un modelo celular tridimensional basado en soportes no entrecruzados de colágeno tipo I biocompatible, que soporta la formación de monocapas endoteliales y que sirvió como modelo para estudiar los mecanismos de patogenicidad inducidos por *A. actinomycetemcomitans* en monocapas de HCAEC. Los resultados de los estudios de infección adelantados evidenciaron que *A. actinomycetemcomitans* induce o aumenta la secreción de citocinas que favorecen la adhesión y migración de monocitos en las HCAEC. Igualmente, que aumenta la expresión de TGF- β 1 quien tiene el potencial de inducir transiciones endotelio-mesénquima. El modelo desarrollado puede ser utilizado para evaluar mecanismos de patogenicidad inducidos por otros periodontopatógenos al infectar a las células endoteliales y para encontrar evidencia de la asociación de estas bacterias con la aterosclerosis.

7.2 Recomendaciones

1. El presente modelo de cultivo 3D-HCEAC permitió evaluar *in vitro* el comportamiento de una monocapa celular, por lo que sería interesante profundizar con experimentos con co-cultivos con células que hacen parte del endotelio vascular como son fibroblastos y/o células de musculo liso y estudiar sus interacciones.
2. El modelo será utilizado para evaluar el efecto de otras cepas de *A. actinomycetemcomitans* junto con otros periodontopatogenos para evaluar su potencial aterosclerótico en un modelo de coinfección.
3. Debido a que en la metodología desarrollada se determinaron factores proinflamatorios secretados por HCEAC cuando se infectaron con *A. actinomycetemcomitans*, se podría profundizar en los mecanismos de patogenia con el empleo de inhibidores de TLR-2 y TLR-4. Así como en los mecanismos de sobrevivencia de la bacteria dentro de los monocitos luego de la endocitosis.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkareem, A. A., Shelton, R. M., Landini, G., Cooper, P. R., & Milward, M. R. (2018). Potential role of periodontal pathogens in compromising epithelial barrier function by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Journal of periodontal research*, 53(4), 565-574.
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., ... & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016.
- Alekseeva, T., Unger, R. E., Brochhausen, C., Brown, R. A., & Kirkpatrick, J. C. (2014). Engineering a microvascular capillary bed in a tissue-like collagen construct. *Tissue Engineering Part A*, 20(19-20), 2656-2665.
- Al-Soudi, A., Kaaij, M. H., & Tas, S. W. (2017). Endothelial cells: From innocent bystanders to active participants in immune responses. *Autoimmunity reviews*, 16(9), 951-962.
- Ambrosio, N., Marín, M. J., Laguna, E., Herrera, D., Sanz, M., & Figuero, E. (2019). Detection and quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. *Archives of Oral Biology*, 98, 213–219. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.archoralbio.2018.11.025>
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517-5527.
- Ardila Medina, C. M., Alzate Vega, J., & Guzmán Zuluaga, I. C. (2010). Asociación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y microorganismos del complejo rojo con parámetros clínicos de pacientes con periodontitis crónica. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 14(3), 0-0.
- Atarbashi-Moghadam, F., Havaei, S. R., Havaei, S. A., Hosseini, N. S., Behdadmehr, G., & Atarbashi-Moghadam, S. (2018). Periopathogens in atherosclerotic plaques of patients with both cardiovascular disease and chronic periodontitis. *ARYA atherosclerosis*, 14(2), 53.
- Balashova NV, Crosby JA, Al Ghofaily L, Kachlany SC. La leucotoxina confiere actividad beta-hemolítica a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* . *Infect Immun*. 2006; 74 : 2015–21.
- Barbosa-Ribeiro, M., Arruda-Vasconcelos, R., de-Jesus-Soares, A., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., de Almeida, J. F. A., & Gomes, B. P. (2019). Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clinical Oral Investigations*, 23(6), 2759-2766.

- Benakanakere, M., & Kinane, D. F. (2012). Innate cellular responses to the periodontal biofilm. *In Periodontal Disease* (Vol. 15, pp. 41-55). Karger Publishers.
- Brown, R. A., Wiseman, M., Chuo, C. B., Cheema, U., & Nazhat, S. N. (2005). Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano-and microstructures by plastic compression. *Advanced Functional Materials*, 15(11), 1762-1770.
- Bustos, R. H., Suesca, E., Millán, D., González, J. M., & Fontanilla, M. R. (2014). Real-time quantification of proteins secreted by artificial connective tissue made from uni-or multidirectional collagen I scaffolds and oral mucosa fibroblasts. *Analytical chemistry*, 86(5), 2421-2428.
- Chan, E. C., Kuo, S. M., Kong, A. M., Morrison, W. A., Dusting, G. J., Mitchell, G. M., ... & Liu, G. S. (2016). Three-dimensional collagen scaffold promotes intrinsic vascularisation for tissue engineering applications. *PloS one*, 11(2), e0149799.
- Chattopadhyay, S., & Raines, R. T. (2014). Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101(8), 821-833.
- Chen, P. Y., Qin, L., Baeyens, N., Li, G., Afolabi, T., Budatha, M., ... & Simons, M. (2015). Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *The Journal of clinical investigation*, 125(12), 4514-4528.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Links between atherosclerotic and periodontal disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(1), 220-235.
- Cui, H., Zhu, W., Huang, Y., Liu, C., Yu, Z. X., Nowicki, M., ... & Zhou, Y. (2019). In vitro and in vivo evaluation of 3D bioprinted small-diameter vasculature with smooth muscle and endothelium. *Biofabrication*, 12(1), 015004.
- Damek-Poprawa, M., Haris, M., Volgina, A., Korostoff, J., & DiRienzo, J. M. (2011). Cytolethal distending toxin damages the oral epithelium of gingival explants. *Journal of dental research*, 90(7), 874-879.
- Davalos, D., & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(1), 43–62. doi:10.1007/s00281-011-0290-8
- DeINero, P., Lane, M., Verbridge, S. S., Kwee, B., Kermani, P., Hempstead, B., ... & Fischbach, C. (2015). 3D culture broadly regulates tumor cell hypoxia response and angiogenesis via pro-inflammatory pathways. *Biomaterials*, 55, 110-118.
- Díaz Zúñiga, J., Yáñez Figueroa, J., Melgar Rodríguez, S., Álvarez Rivas, C., Rojas Lagos, C., & Vernal Astudillo, R. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la

- periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 5(1), 40-45.
- Dietmann, A., Millonig, A., Combes, V., Couraud, P. O., Kachlany, S. C., & Grau, G. E. (2013). Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 61-62, 43–50. doi:10.1016/j.micpath.2013.05.001.
- Dong, C., & Lv, Y. (2016). Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers*, 8(2), 42.
- Echazú, M. I. A., Tuttolomondo, M. V., Foglia, M. L., Mebert, A. M., Alvarez, G. S., & Desimone, M. F. (2016). Advances in collagen, chitosan and silica biomaterials for oral tissue regeneration: from basics to clinical trials. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(43), 6913-6929.
- Echeverría C, Montorfano I, Sarmiento D, et al. Lipopolysaccharide induces a fibrotic-like phenotype in endothelial cells. *J Cell Mol Med*. 2013;17(6):800–814. doi:10.1111/jcmm.12066.
- Echeverría C, Montorfano I, Tapia P, Riedel C, Cabello-Verrugio C, Simon F. Endotoxin-induced endothelial fibrosis is dependent on expression of transforming growth factors $\beta 1$ and $\beta 2$ [published correction appears in *Infect Immun*. 2016 Feb;84(2):609-10]
- El Kholy, K., Genco, R. J., & Van Dyke, T. E. (2015). Oral infections and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 315-321.
- Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, et al. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun*. 2016; 7:11853. Published 2016 Jun 24. doi:10.1038/ncomms11853.
- Espinosa, L., Sosnik, A., & Fontanilla, M. R. (2010). Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. *Tissue Engineering Part A*, 16(5), 1667-1679.
- Ettinger, G., MacDonald, K., Reid, G., & Burton, J. P. (2014). The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut microbes*, 5(6), 719-728.
- Féléto, M. (2011, June). The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators. In *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* (Vol. 3, No. 4, pp. 1-306). Morgan & Claypool Life Sciences.
- Fontanilla, M. R., & Espinosa, L. G. (2012). *In vitro* and *in vivo* assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft. *Tissue Engineering Part A*, 18(17-18), 1857-1866.

-
- Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, 188(1), 11-19.
- Garipcan, B., Maenz, S., Pham, T., Settmacher, U., Jandt, K. D., Zanow, J., & Bossert, J. (2011). Image analysis of endothelial microstructure and endothelial cell dimensions of human arteries—a preliminary study. *Advanced engineering materials*, 13(1-2), B54-B57.
- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531-1546.
- George, E. L., Baldwin, H. S., & Hynes, R. O. (1997). Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood*, 90(8), 3073-3081.
- Gholizadeh, P., Pormohammad, A., Eslami, H., Shokouhi, B., Fakhrzadeh, V., & Kafil, H. S. (2017). Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial pathogenesis*, 113, 303-311.
- Gimbrone Jr, M. A., & García-Cardena, G. (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), 620-636.
- Gualtero, D. F., Viafara-Garcia, S. M., Morantes, S. J., Buitrago, D. M., Gonzalez, O. A., & Lafaurie, G. I. (2017). Rosuvastatin inhibits interleukin (IL)-8 and IL-6 production in human coronary artery endothelial cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b. *Journal of periodontology*, 88(2), 225-235.
- Gualtero Escobar, Diego Fernando (2018). Desarrollo de un modelo celular endotelial tridimensional para la evaluación del efecto de lipopolisacáridos de *Porphyromonas gingivalis* en la expresión de algunos marcadores inflamatorios. (Tesis Doctorado en Biotecnología). Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Gualtero, D. F., Lafaurie, G. I., & Fontanilla, M. R. (2018). Two-dimensional and three-dimensional models for studying atherosclerosis pathogenesis induced by periodontopathogenic microorganisms. *Molecular oral microbiology*, 33(1), 29-37.
- Gualtero, D. F., Lafaurie, G. I., & Fontanilla, M. R. (2019). Differential responses of endothelial cells on three-dimensional scaffolds to lipopolysaccharides from periodontopathogens. *Molecular Oral Microbiology*, 34(5), 183-193.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Patel, M. R., & Song, X. (2008). Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral microbiology and immunology*, 23(3), 196-205.
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2014). Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *European journal of immunology*, 44(2), 328-338.

- Hajishengallis, G., & Moutsopoulos, N. M. (2016). Role of bacteria in leukocyte adhesion deficiency-associated periodontitis. *Microbial pathogenesis*, 94, 21-26.
- Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., & Yamamoto, M. (2011). *Porphyromonas gingivalis* stimulates monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), 57-65.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* : ¿Un periodontopatógeno triple A*? *Periodontol 2000*. 2010; 54 : 78-105.
- Hess, S., Methe, H., Kim, J. O., & Edelman, E. R. (2009). NF- κ B Activity in Endothelial Cells Is Modulated by Cell Substratum Interactions and Influences Chemokine-Mediated Adhesion of Natural Killer Cells. *Cell transplantation*, 18(3), 261-273.
- Herbert, B. A., Novince, C. M., & Kirkwood, K. L. (2016). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Molecular oral microbiology*, 31(3), 207-227.
- Ho, S. T., & Hutmacher, D. W. (2006). A comparison of micro CT with other techniques used Höglund Åberg C, Antonoglou G, Haubek D, Kwamin F, Claesson R, Johansson A y col. Toxina de distensión citoletal en aislados de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de adolescentes de Ghana y asociación con el serotipo y la progresión de la enfermedad. *Más uno*. 2013; 8 : e65781. in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, 27(8), 1362-1376.
- Im, S. I., Heo, J., Kim, B. J., Cho, K. I., Kim, H. S., Heo, J. H., & Hwang, J. Y. (2018). Impact of periodontitis as representative of chronic inflammation on long-term clinical outcomes in patients with atrial fibrillation. *Open heart*, 5(1), e000708.
- Imai, H., Fujita, T., Kajiya, M., Ouhara, K., Yoshimoto, T., Matsuda, S., ... & Kurihara, H. (2016). Mobilization of TLR4 into lipid rafts by *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* in gingival epithelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(5), 1777-1786.
- Indolfi, L., Baker, A. B., & Edelman, E. R. (2012). The role of scaffold microarchitecture in engineering endothelial cell immunomodulation. *Biomaterials*, 33(29), 7019-7027.
- Islam, K., Timraz, S. B. H., Nasser, R., Gater, D. L., Pearson, Y. E., & Christoforou, N. (2016). Co-culture methods used to model atherosclerosis *in vitro* using endothelial, smooth muscle and monocyte cells. *SM J Biomed Eng*, 2(1), 1008.
- Johansson A, Claesson R, Hänström L, Sandström G, Kalfas S. Desgranulación de leucocitos polimorfonucleares inducida por leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* . *J Periodontal Res*. 2000; 35 : 85–92.

-
- Kallio, K. E., Hyvärinen, K., Kovanen, P. T., Jauhiainen, M., & Pussinen, P. J. (2013). Very low-density lipoproteins derived from periodontitis patients facilitate macrophage activation via lipopolysaccharide function. *Metabolism*, 62(5), 661-668.
- Kebschull, Á., Demmer, R. T., & Papapanou, P. N. (2010). "Gum bug leave my heart alone!"—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research*, 89(9), 879-902.
- Kelk, P., Claesson, R., Chen, C., Sjöstedt, A., & Johansson, A. (2008). IL-1 β secretion induced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(5-6), 529-541.
- Kelk, P., Abd, H., Claesson, R., Sandström, G., Sjöstedt, A., & Johansson, A. (2011). Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Cell death & disease*, 2(3), e126-e126.
- Kennedy, S., & Touyz, R. M. (2019). Anatomy and Pharmacology of Vessels. In *Textbook of Vascular Medicine* (pp. 3-11). Springer, Cham.
- King EO, Tatum HW. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Hemophilus aphrophilus*. *J Infect Dis*. 1962;111:85–94
- Kisling, A., Lust, R. M., & Katwa, L. C. (2019). What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? *Life sciences*, 228, 30-34.
- Kovacic, J. C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M., & Fuster, V. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*, 125(14), 1795-1808.
- Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(1), 61-86.
- Libby, P., Lichtman, A. H., & Hansson, G. K. (2013). Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*, 38(6), 1092-1104.
- Liu, B., Faller, L. L., Klitgord, N., Mazumdar, V., Ghodsi, M., Sommer, D. D., ... & Stine, O. C. (2012). Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PloS One*, 7(6), e37919.
- Mahler, G. J., Farrar, E. J., & Butcher, J. T. (2013). Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(1), 121-130.
- Manon-Jensen, T., Kjeld, N. G., & Karsdal, M. A. (2016). Collagen-mediated hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(3), 438-448.
- Martins-Green, M., Petreaca, M., & Yao, M. (2008). An assay system for *in vitro* detection of permeability in human "endothelium". *Methods in enzymology*, 443, 137-15.

- McCoy, M. G., Seo, B. R., Choi, S., & Fischbach, C. (2016). Collagen I hydrogel microstructure and composition conjointly regulate vascular network formation. *Acta biomaterialia*, 44, 200-208.
- Mesa, F., Magan-Fernandez, A., Castellino, G., Chianetta, R., Nibali, L., & Rizzo, M. (2019). Periodontitis and mechanisms of cardiometabolic risk: novel insights and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(2), 476-484.
- Methe, H., & Edelman, E. R. (2006). Tissue engineering of endothelial cells and the immune response. In *Transplantation proceedings* (Vol. 38, No. 10, pp. 3293-3299). Elsevier.
- Methe H, Hess S, & Edelman ER. (2007). Endothelial Immunogenicity-A Matter of Matrix Microarchitecture. *Journal of Vascular Research*, 43(6), 535-536.
- Methe, H., Hess, S., & Edelman, E. R. (2008). The effect of three-dimensional matrix-embedding of endothelial cells on the humoral and cellular immune response. In *Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 2, pp. 117-122). Academic Press.
- Millán, D., Chiriboga, C., Patarroyo, M. A., & Fontanilla, M. R. (2013). *Enterococcus faecalis* internalization in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Microbial Pathogenesis*, 57, 62-69.
- Monzón, J., Acuña, M., Caramello, C., & Sesín, J. (2017). Periodontitis como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. *Revista de la Facultad de Odontología*, 10(1), 32-37.
- Moutsopoulos, N. M., & Konkel, J. E. (2018). Tissue-specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends in Immunology*, 39(4), 276-287.
- Mozos, I., & Stoian, D. (2019). Oral Health and Cardiovascular Disorders. In *Crosstalk in Biological Processes*. *IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.85708.
- Murikipudi, S., Methe, H., & Edelman, E. R. (2013). The effect of substrate modulus on the growth and function of matrix-embedded endothelial cells. *Biomaterials*, 34(3), 677-684.
- Murray, J. L., Connell, J. L., Stacy, A., Turner, K. H., & Whiteley, M. (2014). Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *Journal of microbiology*, 52(3), 188-199.
- Nakamura, N., Yoshida, M., Umeda, M., Huang, Y., Kitajima, S., Inoue, Y., ... & Iwai, T. (2008). Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis*, 196(1), 59-67.
- Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Tamura, K., Miyamoto, E., ... & Ooshima, T. (2007). Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

- in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral microbiology and immunology*, 22(2), 136-139.
- Ng, H. M., Kin, L. X., Dashper, S. G., Slakeski, N., Butler, C. A., & Reynolds, E. C. (2016). Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. *Microbial Pathogenesis*, 94, 60-69.
- Niu, J., & Kolattukudy, P. E. (2009). Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical science*, 117(3), 95-109.
- O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3), 88-95.
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., & Oyen, M. L. (2015). Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 42, 19-25.
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., & Oyen, M. L. (2016). Structural determinants of hydration, mechanics and fluid flow in freeze-dried collagen scaffolds. *Acta biomaterialia*, 41, 193-203.
- Ohtani, M., & Nishimura, T. (2020). Sulfur-containing amino acids in aged garlic extract inhibit inflammation in human gingival epithelial cells by suppressing intercellular adhesion molecule-1 expression and IL-6 secretion. *Biomedical Reports*, 12(3), 99-108.
- Pan, W., Wang, Q., & Chen, Q. (2019). The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International Journal of Oral Science*, 11(3), 1-13.
- Panduwawala, C. P., Zhan, X., Dissanayaka, W. L., Samaranyake, L. P., Jin, L., & Zhang, C. (2017). In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. *Journal of Periodontal Research*, 52(3), 408-418.
- Pérez, L., Muñoz-Durango, N., Riedel, C. A., Echeverría, C., Kalergis, A. M., Cabello-Verrugio, C., & Simon, F. (2017). Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine & growth factor reviews*, 33, 41-54.
- Petreaca, M. L., Yao, M., Liu, Y., DeFea, K., & Martins-Green, M. (2007). Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Molecular biology of the cell*, 18(12), 5014-5023.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., & Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1057.

- Rocco, C. J., Bakaletz, L. O., & Goodman, S. D. (2018). Targeting the HU β protein prevents *Porphyromonas gingivalis* from entering into preexisting biofilms. *Journal of bacteriology*, 200(11), e00790-17
- Rodrigues, P. H., Reyes, L., Chadda, A. S., Bélanger, M., Wallet, S. M., Akin, D., ... & Progulske-Fox, A. (2012). *Porphyromonas gingivalis* strain specific interactions with human coronary artery endothelial cells: a comparative study. *PloS One*, 7(12), e52606.
- Saxton, A., & Manna, B. (2019). Anatomy, Thorax, Heart Right Coronary Arteries. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. Sitio Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537357/>
- Séguier, S., Gogly, B., Bodineau, A., Godeau, G., & Brousse, N. (2001). Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *Journal of Periodontology*, 72(10), 1398-1406.
- Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, Kipps B, Tew JG. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet-activating factor. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):5416-9.
- Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(10), 647-664.
- Sheehy, E. J., Cunniffe, G. M., & O'Brien, F. J. (2018). Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. In *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* (pp. 127-150).
- Skaria, T., Bachli, E., & Schoedon, G. (2017). Wnt5A/Ryk signaling critically affects barrier function in human vascular endothelial cells. *Cell adhesion & migration*, 11(1), 24-38.
- Smith, P. C., & Martínez, C. (2018). Wound Healing in the Oral Mucosa. In *Oral Mucosa in Health and Disease* (pp. 77-90). Springer, Cham.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent Jr, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., ... & Zeugolis, D. I. (2019). The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced Materials*, 31(1), 1801651.
- Suesca Quintero, Edward. (2013). Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial. (Doctorado en Ciencias Farmacéuticas), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

-
- Suesca, E., Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., de Sousa, H. C., & Fontanilla, M. R. (2017). Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 333-341.
- Sumpio, B. E., Riley, J. T., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(12), 1508-1512.
- Suprith, S. S., Setty, S., Bhat, K., & Thakur, S. (2018). Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and assessment of leukotoxin in periodontal disease: a clinico-microbiological study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(3), 201.
- Torras, N., García-Díaz, M., Fernández-Majada, V., & Martínez, E. (2018). Mimicking epithelial tissues in three-dimensional cell culture models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 197.
- Toyofuku, T., Inoue, Y., Kurihara, N., Kudo, T., Jibiki, M., Sugano, N., ... & Izumi, Y. (2011). Differential detection rate of periodontopathic bacteria in atherosclerosis. *Surgery today*, 41(10), 1395
- Vega, B. A., Schober, L. T., Kim, T., Belinka, B. A., & Kachlany, S. C. (2019). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin (LtxA) requires death receptor fas, in addition to LFA-1, to trigger cell death in T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 87(8), e00309–e00319. doi:10.1128/iai.00309-19
- Viáfara-García, S. M., Gualtero, D. F., Avila-Ceballos, D., & Lafaurie, G. I. (2018). *Eikenella corrodens* lipopolysaccharide stimulates the pro-atherosclerotic response in human coronary artery endothelial cells and monocyte adhesion. *European Journal of Oral Sciences*, 126(6), 476–484. doi:10.1111/eos.12580.
- Walters, B. D., & Stegemann, J. P. (2014). Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta biomaterialia*, 10(4), 1488-1501.
- Webber, B., & Hoerstrup, S. P. (2014). Human bioengineered artery models for *in vitro* atherosclerosis research: fact or fiction?. *Alternatives to Laboratory Animals*, 42(3), P28-P32.
- Webber, M. J., Khan, O. F., Sydlik, S. A., Tang, B. C., & Langer, R. (2015). A perspective on the clinical translation of scaffolds for tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, 43(3), 641-656.

- Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L. M., von Andrian, U. H., van Rheenen, J., ... & Friedl, P. (2009, October). Collagen-based cell migration models *in vitro* and *in vivo*. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, No. 8, pp. 931-941). Academic Press.
- Wu, Y., Xu, W., Hou, J., Liu, Y., Li, R., Liu, J., ... & Zhang, D. (2019). *Porphyromonas gingivalis*-Induced MIF Regulates Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in EA. hy926 Cells and Monocyte-Endothelial Cell Adhesion Through the Receptors CD74 and CXCR4. *Inflammation*, 42(3), 874-883.
- Xu, W., Pan, Y., Xu, Q., Wu, Y., Pan, J., Hou, J., ... & Zhang, D. (2018). *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 promotes intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells and monocyte-endothelial cell adhesion through macrophage migration inhibitory factor. *BMC microbiology*, 18(1), 16.
- Yew, H. S., Chambers, S. T., Roberts, S. A., Holland, D. J., Julian, K. A., Raymond, N. J., ... & Murdoch, D. R. (2014). Association between HACEK bacteraemia and endocarditis. *Journal of medical microbiology*, 63(6), 892-895.
- Yilmaz, Ö., & Lee, K. L. (2015). The inflammasome and danger molecule signaling at the crossroads of inflammation and pathogen persistence in the oral cavity. *Periodontology 2000*, 69(1), 83-95.
- Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral Actinobacillus actinomycetemcomitans and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun*. 1983;41:19–27
- Zhang, D., Zheng, H., Zhao, J., Lin, L., Li, C., Liu, J., & Pan, Y. (2011). *Porphyromonas gingivalis* induces intracellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells through the nuclear factor-kappaB pathway, but not through the p38 MAPK pathway. *Journal of periodontal research*, 46(1), 31-38.