



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“EFECTO DEL CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRILLO SOBRE LA
REMODELACIÓN DE MATRICES TRIDIMENSIONALES DE COLÁGENO
POBLADAS POR FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS”

Memoria de título para optar al título profesional de Bioquímico

Anibal Romero Frabasile

Director

Dr. Patricio Smith Ferrer
Laboratorio de Fisiología Periodontal
Centro de Investigaciones
Médicas (CIM)
Carrera de Odontología
Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch
Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2012

Proyecto FONDECYT 1090142

Agradecimientos.

Resulta muy necesario agradecer a quienes me han ayudado y han apoyado durante este importante proceso. De alguna u otra forma, las personas involucradas contribuyeron activamente al desarrollo de este trabajo.

Primero, agradecer a la comisión evaluadora de esta memoria de título, doctores Daniela Seelenfreund, María Antonieta Valenzuela y Mario Chiong. Su retroalimentación crítica complementó invaluablemente este trabajo. Más aun, su interminable dedicación docente a través del pregrado está plasmada en las líneas de esta memoria, y en mi quehacer como científico. Especialmente, agradecer a la Dra. Daniela Seelenfreund por asumir el patrocinio y guiarme en este último tramo de formación académica.

Agradecer también al Dr. Patricio Smith, director de esta memoria. Gracias Pato por abrirme las puertas de tu laboratorio hace ya 4 años. Gracias por la confianza, por la preocupación por mi desarrollo, y por las experiencias que han convertido el paso por el laboratorio, una etapa de aprendizaje incalculable.

Quiero agradecer a los compañeros de laboratorio Mónica, Rodrigo, Daniel e Ignacio, que hacen del día a día una experiencia entretenida, y a la vez enriquecedora en lo profesional. En especial, agradecer a la Dra. Mónica Cáceres, por su dedicación eterna, incansable y desinteresada en mi formación. El traspaso diario de tu nutrida experiencia ha contribuido enormemente en mi desarrollo como científico.

También quiero recalcar lo importante que resultan los compañeros de 'camino', los amigos que tomaron la misma ruta y que durante 5 o más años hicimos del pregrado una experiencia memorable. Gracias a Dasfne, Paula, Begoña, Marcela, Catalina, Camila y Carlos.

Quiero agradecer a 'La Gómez Grande', grupo de amigos con los cuales hemos recurrido a la música como medio para sanar la mente, como idioma para expresar nuestras ideas, y también para recrear la vida.

Por último, quiero agradecer a los amigos más cercanos y a la familia, por su compromiso y apoyo incondicional. A Matías por estar siempre ahí y por su incansable ayuda técnica. A Sandra, Patricio y Javiera -mi familia-, que representan un pilar invisible pero fundamental al momento de enfrentar el día a día. El esfuerzo es de todos. Gracias.

Tabla de contenidos

1.	Índice de figuras	vi
2.	Abreviaturas	vii
3.	Resumen	1
4.	Abstract	3
5.	Introducción	5
5.1.	Reparación en los tejidos periodontales	5
5.2.	Cultivo 3D	13
6.	Problema	16
7.	Hipótesis	16
8.	Objetivo general	16
9.	Objetivos específicos	17
9.1.	Evaluar el efecto del CHC sobre la contracción de cultivos 3D de FGH en geles de colágeno	17
9.2.	Estudiar el efecto del CHC sobre los niveles de proteínas relacionadas con los procesos de remodelación de geles de colágeno poblados con FGH.....	17
10.	Materiales y métodos	18
10.1.	Instrumentos y equipos.....	18
10.2.	Materiales	18
10.3.	Cultivo celular	19
10.4.	Crio-preservación de FGH	20
10.5.	Obtención de colágeno tipo I	20
10.6.	Cultivo 3D de FGH en geles de colágeno	21
10.7.	Ensayo de contracción.....	23
10.8.	Extracción de proteínas	23
10.8.1.	Ensayo de <i>Western blot</i>	24
10.9.	Ensayo de Zimografía.....	25
10.10.	ELISA	26
11.	Resultados	27
11.1.	Efecto del CHC sobre la contracción de geles de	

colágeno poblados de FGH	27
11.1.1. Contracción estimulada por SFB.....	27
11.1.2. Contracción estimulada por TGF- β 1	28
11.2. Efecto del CHC sobre la expresión de α -SMA en cultivos 3D de FGH.....	31
11.3. Efecto del CHC sobre la expresión de integrina β 1 en cultivos 3D de FGH.....	32
11.4. Efecto del CHC sobre la expresión de CTGF en cultivos 3D de FGH.....	33
11.5. Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-2 en cultivos 3D de FGH.....	34
11.6. Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-3 en cultivos 3D de FGH.....	35
11.7. Efecto del CHC sobre la producción de IL-6 en cultivos 3D de FGH.....	36
11.8. Efecto del CHC sobre la producción de PGE ₂ en cultivos 3D de FGH.....	37
12. Discusión	39
12.1. Efecto del CHC sobre la remodelación de cultivos 3D de FGH.....	39
12.2. Cultivo celular y modelo 3D	40
12.3. Contracción de geles de colágeno tipo I	42
12.4. Diferenciación miofibroblástica	43
12.5. CTGF.....	45
12.6. PGE ₂	46
12.7. Conclusiones y proyecciones.....	47
13. Conclusiones	49
14. Referencias	51
15. Anexos.....	58
15.1. Documento de consentimiento informado del paciente donante de tejido	58
15.2. Certificados de aprobación de proyecto del comité de bioética.....	60

1. Índice de figuras.

Figura 1.	<i>Etapas de la reparación tisular.....</i>	8
Figura 2.	<i>Matrices de colágeno I y fibroblastos, en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas'.....</i>	14
Figura 3.	<i>FGH en cultivo 3D de colágeno.....</i>	22
Figura 4.	<i>Efecto del CHC sobre la contracción de geles de colágeno estimulada por SFB.....</i>	28
Figura 5.	<i>Efecto del CHC sobre la contracción de geles de colágeno estimulada por TGF-β1.....</i>	30
Figura 6.	<i>Efecto del CHC sobre la expresión de α-SMA en cultivos 3D de FGH.....</i>	31
Figura 7.	<i>Efecto del CHC sobre la expresión de integrina β1 en cultivo 3D de FGH.....</i>	32
Figura 8.	<i>Efecto del CHC sobre la expresión de CTGF en cultivos 3D de FGH.....</i>	33
Figura 9.	<i>Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-2 en cultivos 3D de FGH.....</i>	34
Figura 10.	<i>Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-3 en cultivos 3D de FGH.....</i>	35
Figura 11.	<i>Efecto del CHC sobre niveles de IL-6 en cultivos 3D de FGH.....</i>	36
Figura 12.	<i>Efecto del CHC sobre los niveles de PGE2 en cultivos 3D de FGH.....</i>	38

2. Abreviaturas.

2D	bidimensional
3D	tridimensional
αMEM	medio esencial mínimo alfa
α-SMA	actina de músculo liso alfa
ANOVA	análisis de la varianza
CaCl₂	cloruro de calcio
CHC	condensado de humo de cigarrillo
CTGF	factor de crecimiento del tejido conectivo
CytD	citocalasina D
DMEM	medio <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	ditiotreitól
FGH	fibroblastos gingivales humanos
HCl	ácido clorhídrico
IL	interleuquina
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteasa de matriz
NaCl	cloruro de sodio
PBS	amortiguador fosfato salino
PGE₂	prostaglandina E ₂
PVDF	difluoruro de polivinilideno
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
TBS	amortiguador Tris salino
TBS-T	TBS tween-20
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
v/v	volumen/volumen

3. Resumen.

La reparación y regeneración de tejidos constituyen eventos críticos al momento de enfrentar y corregir injurias que puedan afectar la homeostasis de los mismos. El tabaquismo es una enfermedad muy prevalente en Chile y en el mundo, es factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad periodontal y diversos componentes del humo de cigarrillo tienen un alto impacto sobre la integridad y funcionalidad celular. Los fenómenos de reparación pueden estudiarse *in vitro* utilizando fibroblastos gingivales humanos (FGH) cultivados en matrices tridimensionales (3D) de colágeno, las cuales se pueden someter a diferentes niveles de tensión mecánica simulando distintas etapas de la remodelación del tejido de granulación.

En el presente estudio se analizó el efecto del condensado de humo de cigarrillo (CHC) sobre las capacidades de remodelación de FGH en un cultivo 3D. Se examinó el efecto del CHC sobre *i*) las capacidades contráctiles de las células dentro de geles de colágeno y *ii*) diversos blancos moleculares implicados en los procesos de reparación de tejidos.

Se pudo observar que 100 $\mu\text{g/mL}$ de CHC disminuyó la contracción de geles de colágeno estimulados por suero fetal bovino y por el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1, "*transforming growth factor β 1*"). Por otro lado, el CHC disminuyó de manera considerable los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) en nuestro modelo 3D de estudio. La carga mecánica presente en la matriz 3D moduló los niveles del factor de crecimiento del tejido

conectivo (CTGF, "connective tissue growth factor") y PGE₂, siendo mayores en la condición de alta tensión mecánica (geles 'tensionados'). Sin embargo, en nuestro modelo 3D, el CHC no modificó los niveles de diversos blancos moleculares que sí se ven alterados por diferentes productos del humo de cigarrillo (nicotina, CHC y extracto del humo de cigarrillo) en placas de cultivo 2D. Estas proteínas fueron actina de músculo liso alfa (α -SMA, "alpha smooth muscle actin"), integrina β 1, metaloproteasa de matriz 2 (MMP-2, "matrix metalloprotease 2"), MMP-3, factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, "connective tissue growth factor") e interleuquina 6 (IL-6).

Finalmente, el CHC altera los procesos celulares vinculados a los fenómenos de reparación y regeneración de tejidos, modulando tanto los procesos contráctiles como los niveles de proteínas implicadas en estos eventos, afectando de esta forma la salud periodontal.

4. Abstract.

“Effect of cigarette smoke condensate on the remodeling of three-dimensional collagen matrices populated by human gingival fibroblasts”

Wound healing and tissue remodeling are critical processes during tissue repair after an injury. Tobacco smoking is a prevalent habit in Chile, is a major risk factor for periodontal disease and several components from cigarette smoke affect cell integrity and functionality. Tissue repair may be studied *in vitro* using three dimensional (3D) collagen matrices populated by human gingival fibroblasts (HGF). These matrices represent distinct steps during granulation tissue remodeling, when they are exposed to different mechanical tensions.

We have analyzed the effect of cigarette smoke condensate (CSC) on HGF remodeling capacities in a 3D model. We evaluated HGF contractile properties in collagen matrices and the production of proteins involved in the regulation of myofibroblasts and granulation tissue contraction. These included α -SMA, β 1 integrin, PGE₂, IL-6, CTGF, MMP-3 and MMP-2.

Our results show that CSC at 100 μ g/mL decreased collagen gel contraction induced by foetal bovine serum and TGF- β 1. Also, PGE₂ levels were strongly diminished by CSC in our 3D model. Matrix mechanical load modified levels of CTGF and PGE₂, where high mechanical tension increased these proteins levels, compared with low tension matrices. However, different proteins involved in wound healing that are affected by several products of cigarette

smoke in a 2D culture model, were unmodified by CSC in our 3D model (α -SMA, β 1 integrin, MMP-2, MMP-3, CTGF and IL-6).

Finally, CSC alters cellular responses involved in wound healing, modifying to a minor extent contractile properties and expression of proteins related to tissue repair processes, thereby affecting periodontal health.

5. Introducción.

5.1. Reparación en los tejidos periodontales.

La encía corresponde a un tejido constituido por un epitelio y un tejido conjuntivo en el cual los fibroblastos conforman la población celular predominante. Este tejido tiene por función evitar la infección del tejido periodontal y permitir una fuerte adhesión de la mucosa oral al tejido óseo y dentario adyacente (Bartold & Narayanan, 2006).

Tanto injurias físicas, químicas y/o bacterianas pueden alterar la indemnidad de la encía. Entre estas, la periodontitis corresponde a una patología inflamatoria de origen infeccioso que manifiesta una elevada prevalencia en la población chilena y mundial, y que puede llevar a la pérdida dentaria (Gamonal *et al.*, 2010). Dada la alta relevancia de la encía en la mantención de la salud periodontal, es muy importante conocer los mecanismos que permiten mantener la homeostasis de este tejido y su capacidad de respuesta frente a diferentes tipos de injurias.

Uno de los factores ambientales que influyen de manera muy relevante en la salud de la encía es el tabaquismo. Datos de la última Encuesta Nacional de Salud de Chile señalan que el 40,6% de la población adulta chilena es fumador actual, lo que demuestra una alta exposición a este factor (MINSAL, 2011). Estudios epidemiológicos han demostrado que el tabaquismo es un importante factor de riesgo para el desarrollo y progresión de la periodontitis (Johnson & Hill, 2004). Los efectos del tabaquismo sobre los tejidos

periodontales incluyen deficiencias en la respuesta inmunitaria local, alteraciones en la funcionalidad de los neutrófilos, metabolismo inadecuado de la matriz extracelular (MEC) y desbalances en los niveles de pro- y anti-oxidantes, los cuales en conjunto podrían favorecer la destrucción del tejido periodontal (Chang *et al.*, 2003; González *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011). En paralelo a esto, la exposición al humo de tabaco altera de manera muy significativa la capacidad de reparación de los tejidos periodontales lo que constituye un problema clínico relevante. La exposición al humo del cigarrillo produce alteraciones a nivel de respuestas celulares como la adhesión, migración, proliferación y síntesis de colágeno (Semlali *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012), fenómenos que contribuyen a explicar las alteraciones de la reparación tisular observadas en fumadores.

Una de las formas de estudiar los efectos del humo de cigarrillo sobre células en cultivo es utilizando un compuesto conocido como condensado de humo de cigarrillo (CHC). Se ha reportado que el humo de cigarrillo está formado por más de 5.000 compuestos diferentes (Talhout *et al.*, 2011) y el CHC corresponde a la fase particulada del humo de cigarrillo, que está compuesta por diferentes elementos tóxicos tales como nicotina, fenol, aldehídos, hidrocarburos, nitrosaminas, metales pesados y agentes carcinógenos (Gao *et al.*, 2006; Talhout *et al.*, 2011). Se ha demostrado también que compuestos volátiles presentes en el humo de cigarrillo afectan el citoesqueleto celular, alterando la organización y polimerización de esta

estructura (Rota *et al.*, 2001). Trabajos previos de nuestro grupo demostraron la toxicidad del CHC, y su efecto sobre las capacidades migratorias de fibroblastos gingivales humanos (FGH) (Silva *et al.*, 2012). Además hemos observado que el CHC activa vías de señalización intracelular que, a través de un mecanismo dependiente del estado óxido-reductor intracelular, lleva a la producción de la serín proteasa uroquinasa vinculada a la remodelación de la MEC (González *et al.*, 2009).

La reparación tisular se caracteriza por una serie de respuestas o fases que incluyen: *i*) hemostasia y fase inflamatoria, *ii*) fase de tejido de granulación y *iii*) fase de remodelación tisular (figura 1). La formación de tejido de granulación se caracteriza por la migración de fibroblastos y vasos sanguíneos desde el tejido periférico a la zona de la herida (Martin, 1997; Gurtner *et al.*, 2008). Este tejido sufre además una importante remodelación en la cual los fibroblastos del tejido cumplen un papel muy relevante. Estas células sufren un proceso de diferenciación hacia un fenotipo conocido como miofibroblasto, gatillado por dos elementos principales como son el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1, “*transforming growth factor β 1*”) y la tensión mecánica generada durante la contracción o remodelación de este tejido (Tomasek *et al.*, 2002).

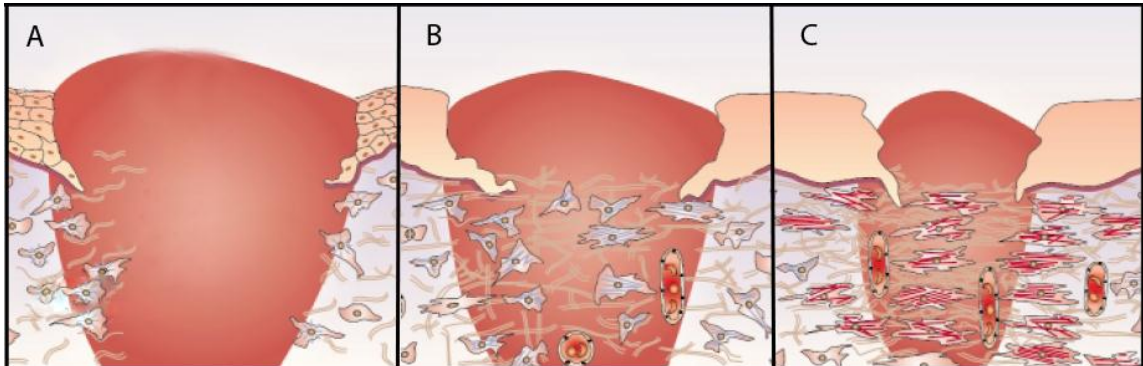


Figura 1. **Etapas de la reparación tisular.** (A) En una primera instancia, se forma un coágulo de fibrina para proteger la herida (hemostasia). La fase inflamatoria contempla un serie de señales químicas secretadas por infiltrado inflamatorio y fibroblastos principalmente que actúan como señales quimiotácticas y de activación. (B) Se comienza a formar el tejido de granulación, en el cual los fibroblastos migran desde los márgenes de la herida hacia el foco de la lesión. (C) Etapa final en que se contrae la herida y existe remodelamiento de la matriz por parte de miofibroblastos (adaptado de Tomasek *et al.*, 2002).

Los miofibroblastos se caracterizan por la expresión de actina de músculo liso alfa (α -SMA, “*alpha smooth muscle actin*”) y por el desarrollo de fuertes contactos de adhesión a la MEC (Dugina *et al.*, 2001). El miofibroblasto comanda la fase contráctil del tejido de granulación, proceso que facilita el cierre de la herida (Leask & Abraham, 2004; Tomasek *et al.*, 2002). Es por esto que factores ambientales que modifiquen tanto las fuerzas de contracción del tejido como la actividad de TGF- β 1 podrían alterar de manera muy relevante la diferenciación de miofibroblastos en el tejido de granulación. Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que la exposición de fibroblastos gingivales de origen humano al CHC inhibe la expresión del marcador de miofibroblastos α -SMA (Silva *et al.*, 2012).

La formación del tejido de granulación consta de una primera fase en la cual los fibroblastos migran desde el tejido periférico a la herida modulando su adhesión a la matriz extracelular circundante. La interacción de estas células con la MEC ocurre a través de receptores de transmembrana conocidos como integrinas (Barrientos *et al.*, 2008; Martin, 1997). Estos están conformados por dos subunidades o cadenas polipeptídicas α y β , que se unen a ligandos presentes en la MEC (Arnaout *et al.*, 2005). Las integrinas reconocen diferentes moléculas presentes en el tejido de granulación. Una de las glicoproteínas que se expresa en forma abundante en el tejido de granulación es fibronectina (Singer & Clark, 1999).

Distintos heterodímeros de integrinas pueden detectar a fibronectina en el medio extracelular, sin embargo la integrina más expresada y estudiada hasta la fecha es $\alpha 5\beta 1$ (Plow *et al.*, 2000). Las integrinas forman parte de un sistema de mecano-transducción entre las fibras de actina y la MEC, pudiendo sensar la carga mecánica de la MEC hacia el intracelular, y contraer la matriz por acción de fibras de actina polimerizada (fibras de estrés) (Hinz, 2007; Jones & Ehrlich, 2011). Las integrinas también participan en la activación de factores de crecimiento, como TGF- $\beta 1$, que se encuentran latentes en la MEC (Worthington *et al.*, 2011; Buscemi *et al.*, 2011). A su vez, la exposición de fibroblastos gingivales a nicotina altera la expresión y distribución celular de la integrina $\beta 1$ (Austin *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002).

Los fibroblastos secretan distintos factores que pueden modular la diferenciación de miofibroblastos y/o la contracción de las células y del tejido de granulación. Entre estos se encuentran TGF- β 1, interleuquina 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE₂), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, "connective tissue growth factor") y metaloproteasas de matriz (MMPs, "matrix metalloproteases"). Se ha visto que IL-6 es una de las citoquinas pro-inflamatorias que participan desde las primeras instancias en los eventos de reparación tisular. IL-6 actúa como inductor de proliferación, quimioattractante y mediador de la respuesta inflamatoria (Werner & Grose, 2003). El ratón *knock-out* para IL-6 tiene severos problemas relacionados con la reparación de tejidos: se demora tres veces más en cicatrizar que el ratón *wild type*, y presenta una reducida población de miofibroblastos (Gallucci *et al.*, 2006). Sin embargo, la exposición al CHC de una línea celular de sinoviocitos -tipo fibroblastos-humanos, produjo un aumento de los niveles de IL-6, medidos a través de ELISA (Shizu *et al.*, 2008).

Otro grupo de proteínas involucradas en los procesos de remodelación de tejidos son las MMPs. Entre las propiedades de las MMPs, se cuentan sus capacidades de proteolizar diversas proteínas de matriz, como también proteínas de adhesión, y proteínas que secuestran factores de crecimiento, entre otras. De esta misma forma, están involucradas en funciones celulares asociadas a procesos de migración, remodelación de matriz y diferenciación celular (Sternlicht & Werb, 2001). Existen reportes sobre ratones deficientes en

MMP-3 que reparan de manera menos efectiva, cerrando heridas más lentamente que los ratones 'silvestres' (Bullard *et al.*, 1999). Otros estudios concluyen que la expresión de MMP-3 responde a fuerzas compresivas, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que sugiere que la estimulación mecánica de las células es importante para la producción de esta MMP (Chang *et al.*, 2008). Existe información dispar respecto del efecto de diversos productos del cigarrillo sobre la expresión y actividad de MMP-3, en varios modelos celulares (Zhang *et al.*, 2009; Bulmanski *et al.*, 2012; Katono *et al.*, 2009). Por otro lado, cuando se comparan los procesos de regeneración de distintas mucosas, MMP-2 aparece como uno de los candidatos responsables de que la mucosa oral sea capaz de regenerar más rápido y de mejor manera que otros tipos de mucosas (Stephens *et al.*, 2001). En un modelo de epitelio nasal humano, se descubrió que MMP-2 aceleraba la reparación de heridas *in vitro*, bajo el estímulo de TGF- β 1 (Lechapt-Zalcman *et al.*, 2006). Al igual que lo que ocurre con MMP-3, existen evidencias discrepantes sobre la expresión de MMP-2, cuando se exponen fibroblastos a productos del cigarrillo (La Rocca *et al.*, 2007; Ning *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011).

Durante el proceso de regeneración coexisten sistemas pro- y anti-fibróticos. Cuando el miofibroblasto no es eliminado o se descontrola la producción de moléculas de tejido conectivo, se puede desarrollar un fenómeno patológico conocido como fibrosis. El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) es un reconocido mediador río abajo de los procesos pro-fibróticos de

TGF- β 1, como los de proliferación de fibroblastos, producción de fibronectina y producción de colágeno (Grotendorst *et al.*, 1996; Leask & Abraham, 2006). CTGF es necesario para la diferenciación miofibroblástica y para la contracción de geles de colágeno, inducidas por TGF- β 1 (Garret *et al.*, 2004). Cabe comentar que explantes de tráquea expuestos a humo directo de cigarrillo aumentan la expresión génica de CTGF (Wang *et al.*, 2005); y que FGH aumentan la expresión de CTGF frente a estímulos de nicotina (Takeuchi *et al.*, 2010). A su vez, PGE₂ es un mediador inflamatorio que participa en el proceso de regeneración de tejidos, y que según la literatura, suprime la expresión de CTGF inducida por TGF- β 1 en varios modelos celulares, excepto en FGH (Kular *et al.*, 2011; Black *et al.*, 2007). Es más, PGE₂ inhibe la diferenciación miofibroblástica (Kolodsick *et al.*, 2003), la respuesta quimiotáctica (Kohyama *et al.*, 2001) y la contracción de geles poblados de fibroblastos pulmonares humanos (Zhu *et al.*, 2001). Con respecto al efecto de extracto de humo de cigarrillo sobre fibroblastos pulmonares humanos, existen reportes sobre aumento (Martey *et al.*, 2004) y descenso (Wang *et al.*, 2003) de los niveles de PGE₂.

5.2. Cultivo 3D.

Uno de los modelos *in vitro* más utilizados para estudiar el proceso de formación de tejido de granulación es el empleo de cultivos 3D de colágeno. Con este propósito se construyen matrices 3D constituidas por colágeno tipo I y fibroblastos. A su vez, existen dos modalidades para generar un mayor o menor grado de tensión mecánica al interior de esta matriz. Los llamados geles 'liberados de tensión' son polimerizados con fibroblastos en su interior y son rápidamente separados de los bordes de la placa de cultivo. Esto permite que las células crezcan en un ambiente en que el colágeno que las rodea está libre de tensión mecánica. En este microambiente las células adquieren un fenotipo redondeado y manifiestan un citoesqueleto de actina muy poco desarrollado (Rhee & Grinnell, 2007). Este tipo de modelo ha sido homologado a los procesos que ocurren en las primeras etapas de la reparación de heridas en la cual predominan los fenómenos de migración celular. Otra opción es la generación de los llamados geles 'tensionados'. Estos geles se caracterizan porque los extremos del gel son mantenidos adheridos a los bordes de la placa de cultivo. Bajo estas condiciones las células están expuestas a un mayor grado de tensión mecánica, desarrollan un fenotipo dendrítico y presentan un citoesqueleto de actina más desarrollado. Las matrices 'tensionadas' desarrollan fenotipos celulares que se asemejan a las etapas tardías de la reparación, relacionadas con contracción (Grinnell *et al.*, 1999) (figura 2).

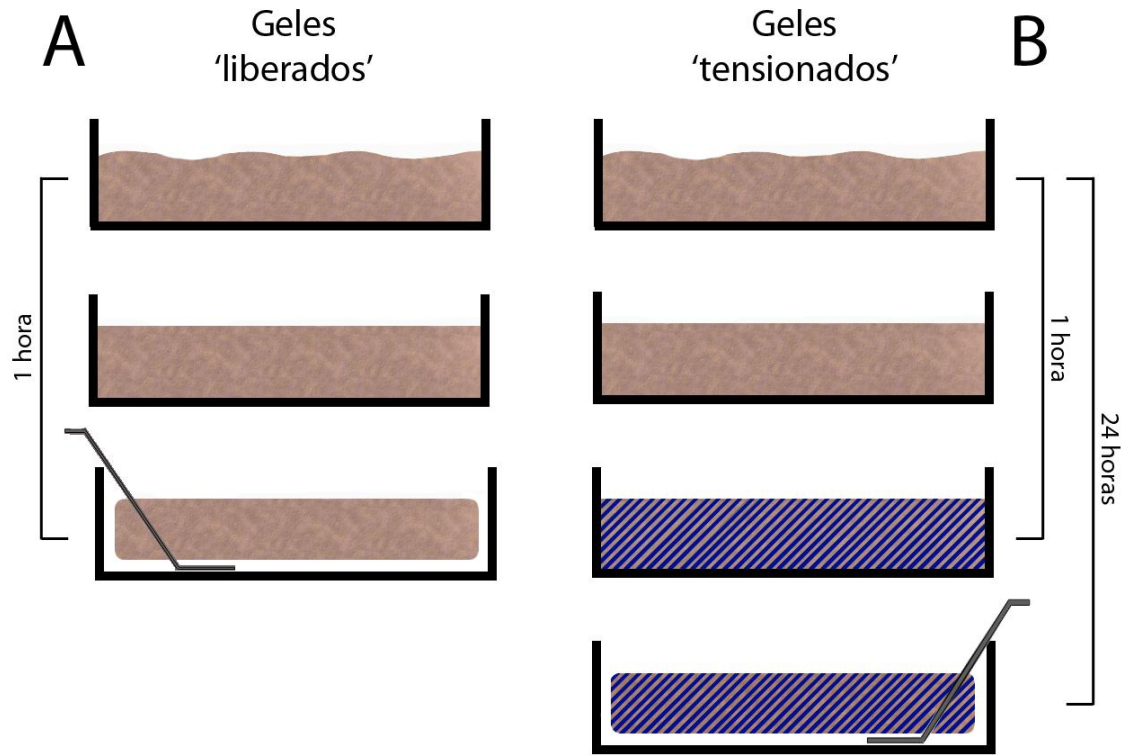


Figura 2. **Matrices de colágeno I y fibroblastos, en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas'.** (A) Los geles 'liberados' corresponden a una solución de colágeno I a 1 mg/mL y FGH, sembrados en una placa de 48 pocillos. Se permite la polimerización del colágeno incubando durante 1 hora a 37 °C, y luego se desprenden los geles de los bordes de la placa, para ser estimulados con el CHC. (B) Los geles 'tensionados' corresponden a una solución de colágeno I a 1 mg/mL y FGH, sembrados en una placa de 48 pocillos. Se permite la polimerización del colágeno durante 1 hora, luego los geles son incubados durante 24 horas con SFB al 10% a 37 °C, y así estas matrices generan tensión mecánica. Posteriormente se desprenden los geles de los bordes de la placa, para ser estimulados con el CHC.

De esta misma forma, existe la necesidad experimental de acercarse a un modelo *in vitro* que acorte la brecha entre el estudio celular en dos dimensiones (placa de cultivo) y los modelos *in vivo* (animal y clínico). Dentro de las limitaciones que presenta el modelo de cultivo en dos dimensiones, podemos comentar que las células están en contacto con una superficie

artificial, plástica y rígida, que afecta tanto la morfología – arquitectura celular, como la expresión de proteínas de unión y anclaje. Esta condición 2D ofrece a la célula una máxima tensión mecánica, situación que no ocurre habitualmente en células *in vivo*. El sistema 3D ofrece un modelo más cercano a la integridad del microambiente en el que se desenvuelven las células en los tejidos, respetando por ejemplo la señalización mecánica y química, y desarrollando además complejas interacciones célula – célula y célula – matriz. Estas interacciones son las que en la realidad fisiológica comandan funciones de proliferación, diferenciación y migración implicadas en el proceso de regeneración (Mazzoleni *et al.*, 2009). Por este motivo, en la presente memoria proponemos analizar los efectos del CHC sobre células en un microambiente 3D.

6. Problema.

El humo de cigarrillo resulta altamente tóxico para los tejidos orales y afecta de manera muy crítica la capacidad de reparación de los tejidos periodontales. Uno de los blancos del humo de cigarrillo es el miofibroblasto y su capacidad para remodelar el tejido de granulación. En el presente estudio proponemos estudiar de qué manera la función del fibroblasto se puede ver alterada durante la reparación del tejido. La remodelación del tejido de granulación y la diferenciación miofibroblástica es afectada por diferentes factores solubles secretados por los propios fibroblastos. Estos incluyen a α -SMA, integrina β 1, CTGF, MMPs, IL-6 y PGE₂. En el presente estudio deseamos indagar de qué manera el CHC afecta la producción de estos factores y la contracción de cultivos 3D de FGH.

7. Hipótesis.

El condensado de humo de cigarrillo inhibe la remodelación de matrices tridimensionales de colágeno pobladas por fibroblastos gingivales humanos.

8. Objetivo general.

Analizar el papel del condensado de humo de cigarrillo sobre la remodelación de fibroblastos gingivales humanos en cultivos tridimensionales.

9. Objetivos específicos.

9.1. Evaluar el efecto del CHC sobre la contracción de cultivos 3D de FGH en geles de colágeno. Se estudiará el grado de contracción de matrices de colágeno estimuladas por suero fetal bovino (SFB) y TGF- β 1, y se analizará el efecto del CHC sobre este fenómeno.

9.2. Estudiar el efecto del CHC sobre los niveles de proteínas relacionadas con los procesos de remodelación de geles de colágeno poblados con FGH. Se analizarán los niveles de proteínas relacionadas con procesos de diferenciación miofibroblástica, adhesión y migración, remodelación de matriz y mediadores inflamatorios. Los FGH se expondrán al CHC, y se analizarán los niveles de las proteínas α -SMA, integrina β 1, CTGF, MMP-2, MMP-3, IL-6, y PGE₂.

10. Materiales y métodos.

10.1. Instrumentos y equipos.

Los instrumentos y equipos utilizados fueron: gabinete de bioseguridad Labtech LCB-1203B; incubadora Memmert INC-108; microscopio invertido de contraste de fase Olympus CKX41, cámara Micrometrics 518CU; centrífuga refrigerada Eppendorf 5415R; lector de placas Thermo Plate TP-Reader NM; microscopio invertido de epifluorescencia Zeiss AX10; cámara QImaging MicroPublisher 3.3 RTV; cámaras de corrida y transferencia Bio-Rad Mini Protean III; baño seco Rocker Sahara 310 Heraeus; y una fuente de poder Major Science mp 250V.

10.2. Materiales.

El CHC se obtuvo de *Murty Pharmaceuticals (Lexington, KY, EE.UU.)*. El anticuerpo primario anti α -SMA (A2547) la estreptomina, gentamicina, penicilina y citocalasina D se adquirió en *Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, EE.UU.)*. El suero fetal bovino se obtuvo de *Biological Industries Israel Beit-Haemek Ltd. (Kibbutz Beit-Haemek, Israel)*. El anticuerpo primario anti MMP-3 (MAB3369) se adquirió en *Millipore Corporation (Billerica, MA, EE.UU.)*. Los anticuerpos primarios anti CTGF (sc-14939) e integrina β 1 (sc-59827) se adquirieron en *Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EE.UU.)*. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti-*mouse*, anti-*rabbit* y anti-*goat* se obtuvieron de *Rockland Immunochemicals Inc. (Gilbertsville, PA,*

EE.UU.). El reactivo de quimioluminiscencia *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* y el anticuerpo primario anti β -tubulina se obtuvieron de *Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.)*. El sistema de reconocimiento de IL-6 por la técnica de ELISA se obtuvo en *eBioscience Inc. (San Diego, CA, EE.UU.)*, y el ELISA para PGE₂ es de *Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA, EE.UU.)*. TGF- β 1 recombinante humano se adquirió de *R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)*.

10.3. Cultivo celular.

Los cultivos de FGH se desarrollaron a partir de muestras de tejido gingival retromolar de pacientes sanos, obtenidas durante la extracción de terceros molares. Los explantes se extrajeron en una clínica privada en Santiago de Chile, bajo el consentimiento informado de los pacientes, y la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (ver anexos). Los explantes se obtuvieron a partir de pacientes mujeres y hombres, no fumadores, y sin historial previo de inflamación de tejido retromolar. Este tejido normalmente es eliminado durante la extracción de terceros molares y no representa por lo tanto un daño significativo para el paciente.

Los cultivos primarios de FGH se obtuvieron por el método del explante (Larjava *et al.*, 1989), procedimiento que permite la migración de células desde el tejido hacia la placa de cultivo, en un tiempo de 3 semanas

aproximadamente. La población de células resultante se cultivó en medio esencial mínimo alfa (α -MEM), el cual contenía suero fetal bovino (SFB) al 10%, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin, a 37 °C en incubador con 5% de dióxido de carbono. Todos los experimentos se realizaron entre el tercer y décimo sub-cultivo.

10.4. Crio-preservación de FGH.

Las células se almacenaron en una mezcla de criopreservación (90% SFB y 10% DMSO) a una densidad de 1×10^6 células/mL. Se congelaron mediante el descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar -196 °C. Las células criopreservadas se almacenaron sumergidas en nitrógeno líquido.

10.5. Obtención de colágeno tipo I.

La solución de colágeno tipo I se preparó a partir de tendones de colas de ratas *Sprague Dawley* (Elsdale & Bard, 1972). Los tendones se lavaron tres veces en PBS, para luego ser pesados y solubilizados en ácido acético 0,1 N estéril, a una proporción de 0,1 g/mL. Los tendones se solubilizaron durante 3 días, a 4 °C y con la ayuda de un agitador magnético. Posteriormente la solución se ultracentrifugó a $17.000 \times g$ durante 2 horas, a 4 °C. El sobrenadante se dializó contra DMEM a pH 4,0 durante 48 horas, renovando el medio cada 24 horas, y en agitación constante a 4 °C. Finalmente, se cuantificó

la concentración de proteínas con el sistema comercial *DC Protein Assay kit* (*Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EE.UU.*).

10.6. Cultivo 3D de FGH en geles de colágeno.

El cultivo 3D de FGH consta de 1×10^5 células embebidas en una solución de colágeno tipo I a una concentración final de 1 mg/mL, neutralizada con DMEM 4x. Esta mezcla se sembró en una placa de 48 pocillos y se incubó durante 1 hora a 37 °C hasta completar su polimerización. Estos geles se generaron bajo dos modalidades: los geles 'liberados' se soltaron de la placa con una espátula inmediatamente después de su polimerización. Los geles 'tensionados' se sometieron a tensión mecánica durante 24 horas en presencia de SFB al 10%, previo a ser soltados de la placa con una espátula (figura 3). Estos geles 'liberados' o 'tensionados' se sometieron a diversos estímulos (Grinnell *et al.*, 1999).

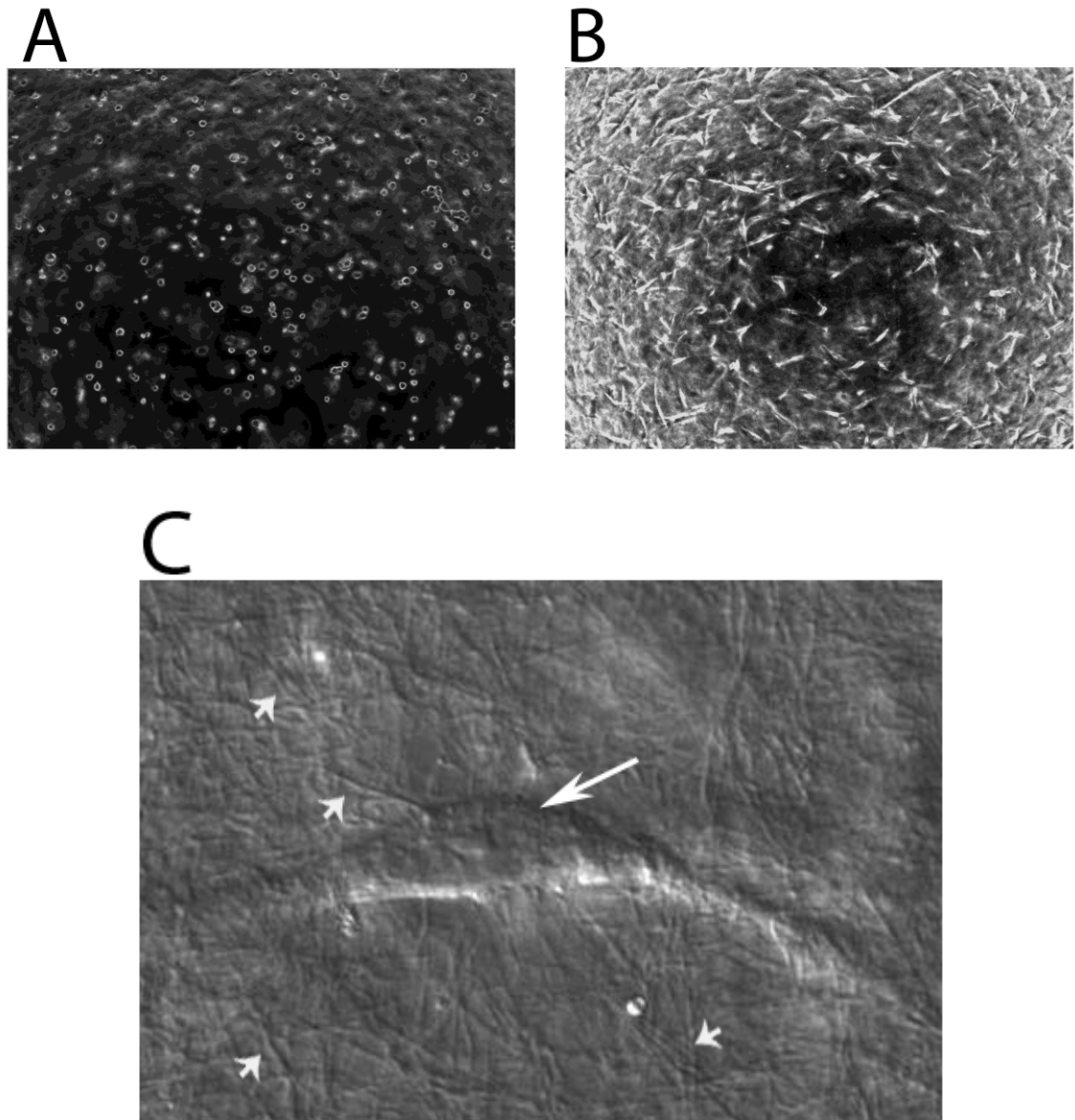


Figura 3. **FGH en cultivo 3D de colágeno.** Fotos obtenidas con un microscopio invertido de contraste de fases (4x) de FGH en matrices 'liberadas' (A) y 'tensionadas' (B). Al cultivar los FGH en matrices libres de tensión (A), las células presentan una morfología redondeada. En matrices bajo tensión mecánica, los FGH desarrollan un fenotipo alargado, similar al que se obtiene en un cultivo 2D. (C) Foto obtenida de un microscopio invertido de epifluorescencia (40x), en la que se puede apreciar un fibroblasto (flechas) y las fibras de colágeno polimerizadas (cabezas de flechas) en nuestro modelo de cultivo 3D.

10.7. Ensayo de contracción.

Se utilizaron geles 3D de colágeno para evaluar la capacidad de contracción de los FGH embebidos en estas matrices. Para esto, se obtuvieron fotografías de los geles en los distintos tiempos a evaluar. Los análisis de contracción se expresaron por un porcentaje que relaciona el área del gel y el área del pocillo, considerando un 100% el área total del pocillo (Gottrup *et al.*, 2000). Para cuantificar las áreas, se delimitó el perímetro de los geles y los pozos con el programa ImageJ, proporcionado por el *National Institute of Health* (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

10.8. Extracción de proteínas.

Para determinar los niveles de proteínas, los FGH se sembraron en geles 3D de colágeno tipo I. Los geles se expusieron a distintos estímulos, y después de 48 horas se recolectaron las proteínas para su análisis. Los geles se lavaron con PBS frío y luego se lisaron sumergiéndolos en tampón de carga que contenía Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, glicerol 10% v/v, SDS 2% p/v, DTT 1 mM y azul de bromofenol 0,01% p/v. Para disolver el colágeno y desnaturar las proteínas, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 16.100 x g durante 10 minutos, a 4 °C. Se rescató el sobrenadante y se trabajó con él inmediatamente. Estas muestras no se almacenaron.

Por otro lado, para evaluar las proteínas secretadas fuera de la célula, se tomó una alícuota de los medios condicionados, la cual se centrifugó a 16.100 x g durante 10 minutos, a 4 °C. El sobrenadante se mezcló con tampón de carga, para luego desnaturar las proteínas a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras no se almacenaron, y se trabajó con ellas inmediatamente.

10.8.1. Ensayo de *Western blot*.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% utilizando una cámara de electroforesis, a 80-100 V. Se utilizó el marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, EE.UU.), previamente activada en metanol durante 1 minuto. Este proceso se llevó a cabo por medio de un sistema de electro-transferencia húmeda a 18 Volts durante 16 horas. Luego, las membranas de PVDF se incubaron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo constituida por leche baja en grasas en polvo al 5% diluida en TBS-Tween 20 (TBS-T, Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 2 mM, Tween 20 0,1%). Posteriormente, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios anti- α -SMA (*mouse*, 1:1.000), anti-CTGF (*goat*, 1:500), anti-MMP-3 (*mouse*, 1:1.000), anti-integrina β 1 (*mouse*, 1:500). Las diluciones se hicieron en una solución de leche al 1% en TBS-T 0,1% con agitación

constante durante 1 hora, a temperatura ambiente. Luego, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T 0,1% durante 10 minutos, y posteriormente se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa (anti-*mouse*, 1:5.000; anti-*goat*, y anti-*rabbit*, 1:8.000), diluidos en TBS-T 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitió la etapa de lavado de las membranas como se indicó anteriormente, y se detectaron los complejos antígeno-anticuerpos con un sistema comercial de quimioluminiscencia (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*) y éstos se capturaron con películas fotográficas (Kodak). Las películas se digitalizaron y el análisis densitométrico se realizó utilizando el programa ImageJ (NIH).

Una vez finalizado este procedimiento las membranas PVDF se trataron con una solución comercial de *stripping* (*Re-blot Plus Strong Solution (10x)*, Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) durante 10 minutos a temperatura ambiente, para remover los anticuerpos unidos. Las membranas se lavaron nuevamente, se bloquearon y se incubaron con anticuerpos dirigidos contra β -tubulina, utilizada como control de carga de proteínas en el gel.

10.9. Ensayo de Zimografía.

Para determinar los niveles de activación de MMP-2 y MMP-3, se evaluó su capacidad colagenolítica y caseinolítica respectivamente, por medio de un ensayo de zimografía en gelatina (MMP-2) y en caseína (MMP-3).

Para esto, se tomó una alícuota de los medios condicionados por los geles poblados con FGH. Esta alícuota se centrifugó a 16.100 x g durante 10 minutos, a 4 °C. El sobrenadante se mezcló con tampón de carga sin agentes reductores, y las muestras se utilizaron inmediatamente. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, a 4 °C, utilizando un equipo de electroforesis a 80 V. Estos geles contenían gelatina 0,5 mg/mL (Sigma), que actuó como sustrato de la MMP-2; o caseína 0,5 mg/mL como sustrato de MMP-3. Posteriormente, los geles se lavaron 2 veces con Tritón X-100 2,5% v/v, para remover el SDS. A continuación se incubaron los geles en una solución de activación de la enzima (Tritón X-100 1,25%, Tris-HCl 10 mM pH 8, CaCl₂ 5 mM) durante 12 horas a 37 °C. El gel se tiñó con una solución de Coomassie 0,25% p/v, metanol 50% v/v y ácido acético 10% v/v, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se destiñó el gel con lavados sucesivos con una solución de metanol 10% v/v y ácido acético 10% v/v, para luego ser fotografiado y analizado mediante el programa ImageJ (NIH).

10.10. ELISA.

Se realizaron las cuantificaciones de los niveles de IL-6 y PGE₂ mediante la técnica de ELISA (“*enzyme-linked immunosorbent assay*”), y los protocolos se siguieron directamente de las recomendaciones del fabricante correspondiente.

11. Resultados.

11.1. Efecto del CHC sobre la contracción de geles de colágeno poblados de FGH.

11.1.1. Contracción estimulada por SFB.

Para comenzar a evaluar el modelo 3D, los geles de colágeno poblados con FGH se incubaron con SFB al 1% durante 24 horas. Como control positivo de la contracción se utilizó SFB al 10%. Se evaluó el efecto de 50, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$ de CHC (figura 4). Estas concentraciones se eligieron de acuerdo a una publicación anterior de nuestro grupo de trabajo, que confirmaba que en pacientes fumadores crónicos es posible detectar concentraciones cercanas a estos valores en los tejidos y que estos niveles de CHC no eran tóxicos para las células (Silva *et al.*, 2012). Se constató que 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$ de CHC disminuyeron la contracción inducida por SFB 1% ($p < 0,01$). Por otro lado se utilizó citocalasina D, que es una toxina que impide la polimerización de actina. Este experimento mostró que la contracción de los geles poblados por fibroblastos fue dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina.

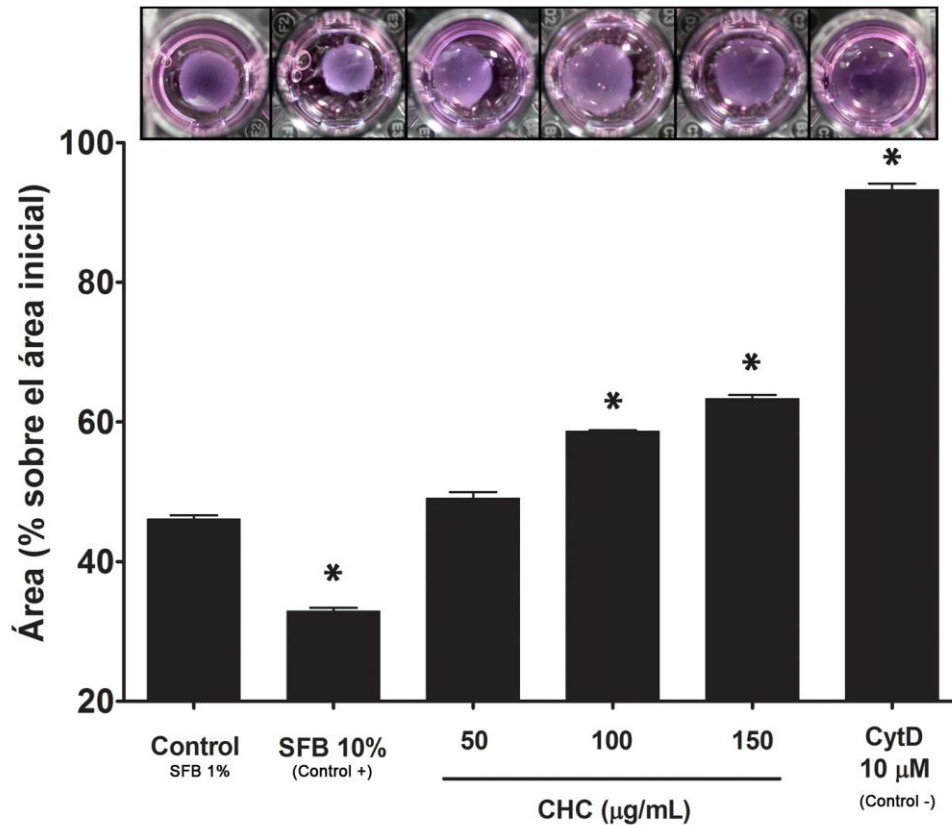


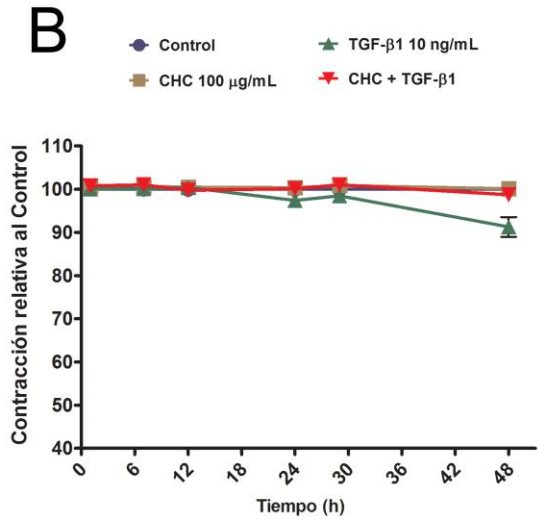
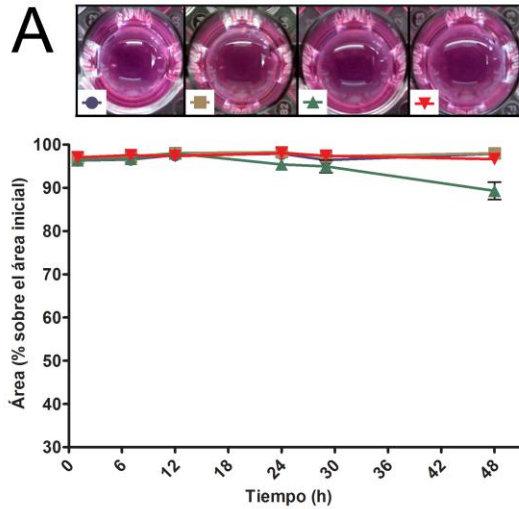
Figura 4. **Efecto del CHC sobre la contracción de geles de colágeno estimulada por SFB.** FGH se cultivaron dentro de geles de colágeno I, incubados con SFB 1% y expuestos a 50, 100 y 150 µg/mL de CHC. Se utilizó SFB 10% como control positivo, y citocalasina D como control negativo. La contracción de los geles se evaluó a las 24 horas. El resultado se obtuvo en triplicado, y los datos se analizaron mediante el test ANOVA, post – test Bonferroni, *p < 0,01 v/s condición control (SFB 1%).

11.1.2. Contracción estimulada por TGF-β1.

A partir de los resultados anteriores, se eligió la concentración de 100 µg/mL de CHC para seguir trabajando. Se utilizó TGB-β1 como estímulo para los cultivos por su implicancia en los procesos reparativos y su relación con los fenómenos de contracción y diferenciación miofibroblástica (Werner & Grose,

2003). Se analizaron FGH cultivados en geles de colágeno estimulados con 10 ng/mL de TGF- β 1 y 100 μ g/mL de CHC. Se evaluó la capacidad contráctil de FGH bajo estas condiciones utilizando modelos de geles 'liberados' y 'tensionados' (ver Introducción, cultivo 3D). En la figura 5 A y B se muestra las variaciones en el diámetro de los geles 'liberados' a diferentes tiempos y en 5 C y D se grafican las mismas variaciones para los geles 'tensionados'. Para analizar estos resultados se utilizaron dos métodos de normalización que consistieron en graficar el porcentaje de variación del área del gel sobre el área inicial (A y C) y la contracción normalizada respecto al control (B y D). Se observó que la capacidad de contracción de los geles 'liberados' fue muy baja, sin encontrarse diferencias significativas entre todos los puntos analizados. En los geles 'tensionados' se observó que 100 μ g/mL de CHC redujo significativamente la contracción de geles de colágeno estimulada por 10 ng/mL de TGF- β 1, a partir de las 7 horas de estímulo ($p < 0,05$) (figura 5 C y D).

Geles 'liberados'



Geles 'tensionados'

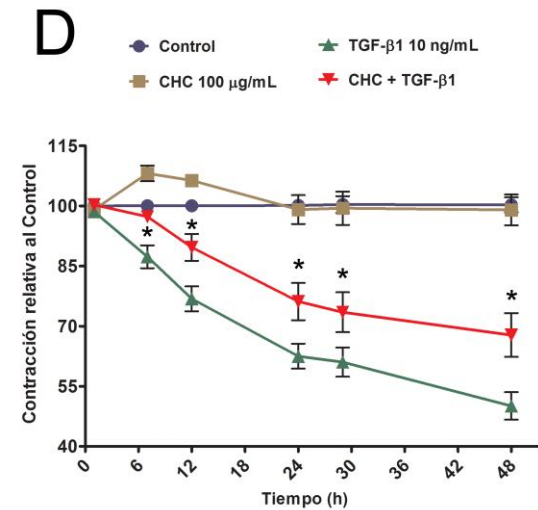
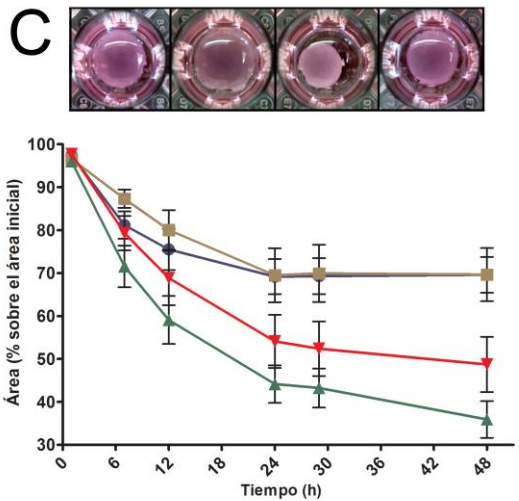


Figura 5. **Efecto del CHC sobre la contracción de geles de colágeno estimulada por TGF-β1.** Geles de colágeno I poblados con FGH se expusieron a 100 μg/mL de CHC, bajo el estímulo de 10 ng/mL de TGF-β1 para su contracción, durante 48 horas. Se obtuvo un registro fotográfico a las 1, 7, 12, 24, 29 y 48 horas de contracción. (A) Tendencia de contracción en el tiempo de geles 'liberados'. (B) Niveles de contracción relativos al control de geles 'liberados'. (C) Tendencia de contracción en el tiempo de geles 'tensionados'. (D) Niveles de contracción relativos al control de geles 'tensionados'. El resultado proviene de 3 experimentos independientes. Se realizó ANOVA, post – test Bonferroni, *p < 0,05 v/s condición estimulada (TGF-β1 10 ng/mL).

11.2. Efecto del CHC sobre la expresión de α -SMA en cultivos 3D de FGH.

Para profundizar el hallazgo sobre efecto del CHC en la reducción de la contracción de geles 'tensionados' estimulados por TGF- β 1, se analizó la expresión de α -SMA ya que esta constituye una isoforma de actina altamente representada en miofibroblastos y entregaría a la célula una mayor capacidad contráctil (Tomasek *et al.*, 2002). Se cultivaron geles de colágeno con FGH, en su condición 'tensionada', durante 48 horas en presencia de 10 ng/mL de TGF- β 1 y 100 μ g/mL de CHC. Se evaluó la expresión de la proteína α -SMA mediante *Western blot* del lisado de los geles (figura 6). Estos experimentos no mostraron diferencias significativas entre los controles y las condiciones estimuladas.

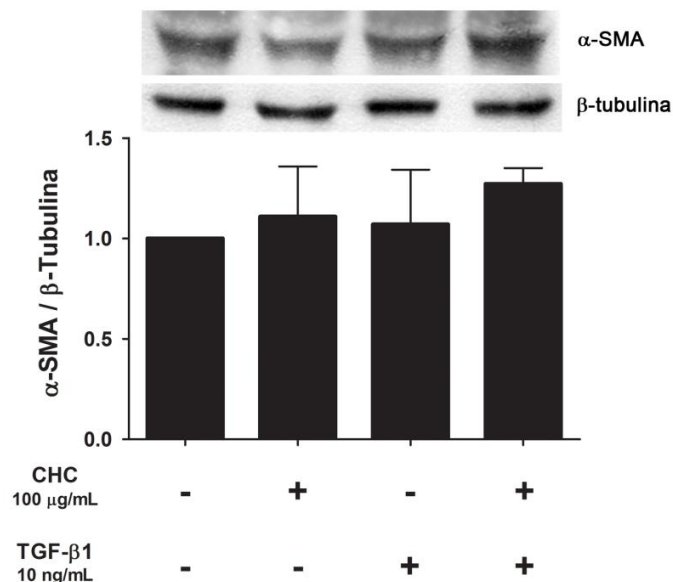


Figura 6. **Efecto del CHC sobre la expresión de α -SMA en cultivos 3D de FGH.** Geles 'tensionados' de colágeno I poblados con FGH se incubaron durante 48 horas con 100 μ g/mL de CHC y 10 ng/mL de TGF- β 1. Los geles se lisaron y se analizó la expresión de α -SMA por *Western blot*. Este resultado proviene de al menos tres experimentos independientes. Se realizó el test estadístico ANOVA.

11.3. Efecto del CHC sobre la expresión de integrina $\beta 1$ en cultivos 3D de FGH.

La integrina $\beta 1$ participa como proteína clave que permite la adhesión de las células a moléculas de la MEC como fibronectina y colágeno, además de estar implicada en procesos de reparación de tejidos (Plow *et al.*, 2000). Se estudió el efecto del CHC sobre la producción de integrina $\beta 1$ en cultivos 3D de FGH. Para esto se cultivaron FGH dentro de geles de colágeno en condiciones ‘liberadas’ y ‘tensionadas’, en presencia de 10 ng/mL de TGF- $\beta 1$ y 100 μ g/mL de CHC durante 48 horas. Se evaluó la expresión de integrina $\beta 1$ mediante *Western blot* del lisado de geles (figura 7), no encontrándose diferencias significativas entre las condiciones controles y estimuladas.

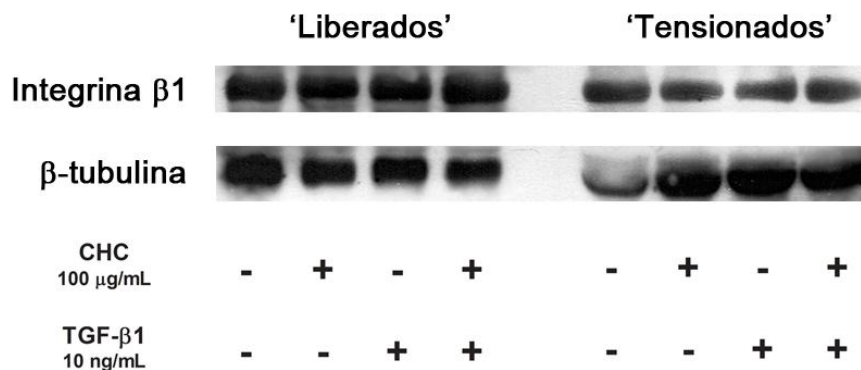


Figura 7. **Efecto del CHC sobre la expresión de integrina $\beta 1$ en cultivo 3D de FGH.** Geles de colágeno I poblados de FGH se incubaron con 10 ng/mL de TGF- $\beta 1$ y 100 μ g/mL de CHC. A las 48 horas, los geles se lisaron y se evaluó la expresión de integrina $\beta 1$ mediante *Western blot*.

11.4. Efecto del CHC sobre la expresión de CTGF en cultivos 3D de FGH.

CTGF es una proteína pro-fibrótica, que ha sido asociada a diferenciación miofibroblástica y a procesos de contracción (Cicha & Goppelt-Struebe, 2009). Para analizar su implicancia en nuestro modelo, se cultivaron geles de colágeno con FGH, ‘liberados’ y ‘tensionados’, durante 48 horas en presencia de 10 ng/mL de TGF- β 1 y 100 μ g/mL de CHC (figura 8). Se evaluaron los niveles de CTGF en el medio condicionado mediante *Western blot* no encontrándose diferencias significativas entre las condiciones controles estimuladas, tanto en los geles ‘liberados’ (figura 8A) como ‘tensionados’ (figura 8B).

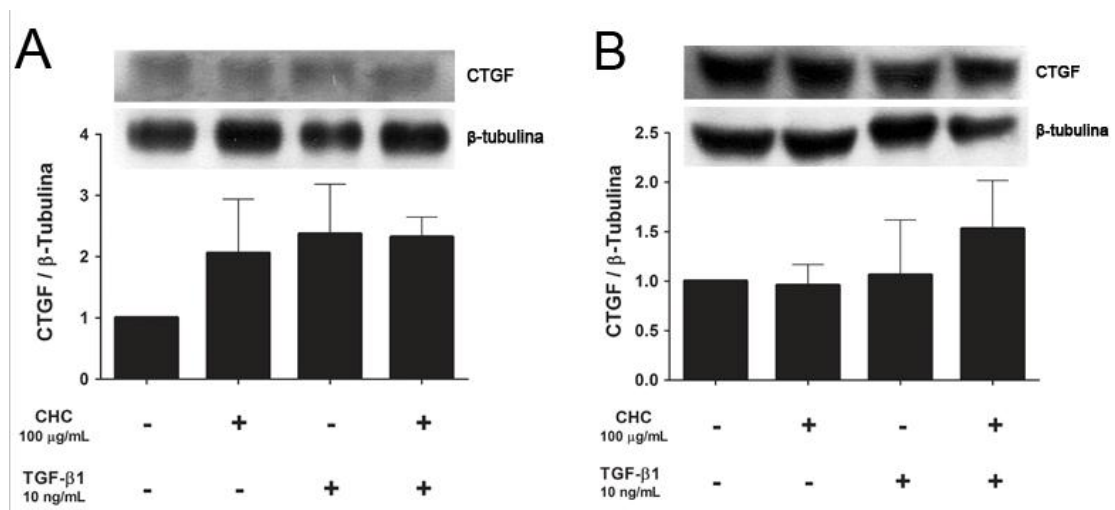


Figura 8. **Efecto del CHC sobre la expresión de CTGF en cultivos 3D de FGH.** (A) Geles ‘liberados’ de colágeno I poblados con FGH. (B) Geles ‘tensionados’ de colágeno I poblados con FGH. Los geles se incubaron con 10 ng/mL de TGF- β 1 y 100 μ g/mL de CHC, y después de 48 horas se evaluó el nivel de CTGF en el medio condicionado mediante *Western blot*. Este resultado se obtuvo a partir de 3 experimentos independientes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

11.5. Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-2 en cultivos 3D de FGH.

Las metaloproteasas de matriz están involucradas en procesos de migración, activación de citoquinas y en procesos de remodelación de matriz (Sternlicht & Werb, 2001). Mediante la técnica de zimografía en gelatina, quisimos analizar cómo se modificaban los niveles de MMP-2 en los medios condicionados de nuestro modelo, bajo el estímulo del CHC. Los FGH se incubaron en geles de colágeno en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas', durante 48 horas frente a 50, 100, y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC (figura 9). Como control positivo se utilizó 10 ng/mL de TGF- β 1. Tanto en geles 'liberados' (figura 9A) como 'tensionados' (figura 9B), no se encontraron diferencias significativas entre los controles y las condiciones estimuladas.

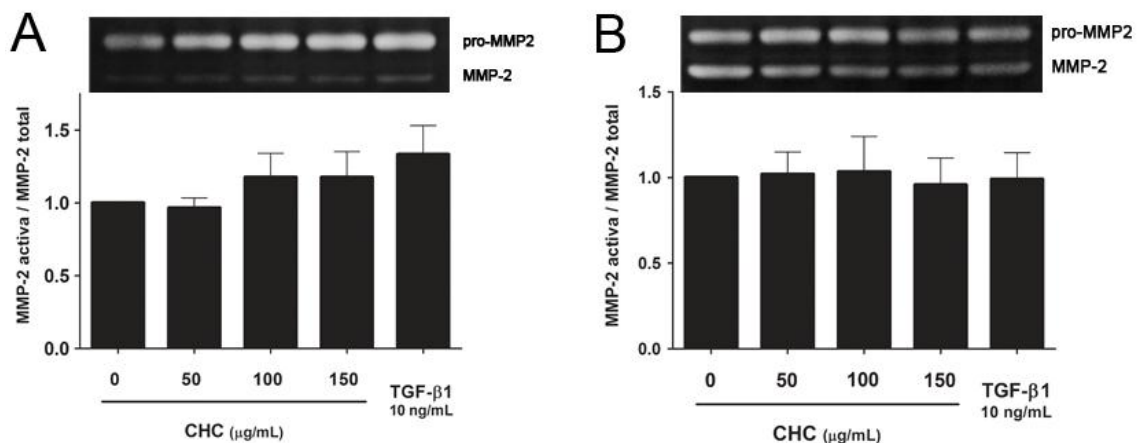


Figura 9. **Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-2 en cultivos 3D de FGH.** Se cultivaron FGH dentro de geles de colágeno I en condiciones 'liberadas' (A) y 'tensionadas' (B). Durante 48 horas, las matrices se expusieron a 50, 100, y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC. Los medios condicionados se evaluaron mediante zimografía en gelatina. Este resultado proviene de tres experimentos independientes. Se aplicó ANOVA como test estadístico.

11.6. Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-3 en cultivos 3D de FGH.

MMP-3 es una metaloproteasa que cumple un papel importante en los fenómenos de reparación de heridas y contracción del tejido de granulación. Dado estos antecedentes, los FGH se cultivaron en geles de colágeno en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas', durante 48 horas frente a 10 ng/mL de TGF- β 1 y 100 μ g/mL de CHC. Se evaluó los niveles de MMP-3 mediante la técnica de *Western blot*, y la actividad de MMP-3 mediante zimografía de caseína (figura 10). Los resultados de este experimento no mostraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones analizadas.

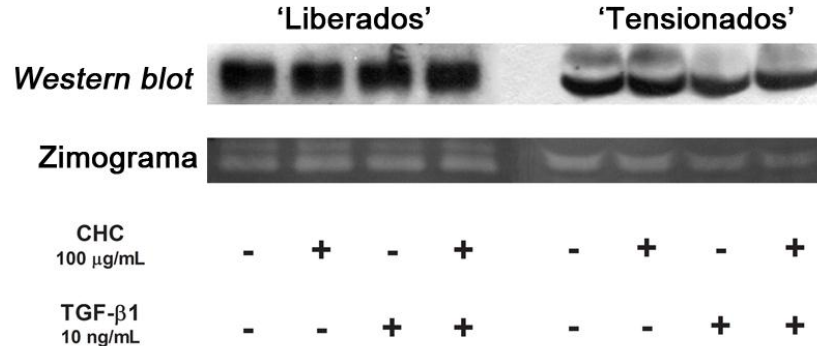


Figura 10. **Efecto del CHC sobre los niveles de MMP-3 en cultivos 3D de FGH.** Geles de colágeno I poblados con FGH, en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas', se expusieron a 10 ng/mL de TGF- β 1 y 100 μ g/mL de CHC. Se evaluaron los niveles de MMP-3 después de 48 horas a partir de los medios condicionados, mediante la técnica de *Western blot* y zimografía en caseína.

11.7. Efecto del CHC sobre la producción de IL-6 en cultivos 3D de FGH.

A partir de medios condicionados por geles poblados con FGH, se analizó si el CHC modificaba los niveles de IL-6 bajo el mismo modelo experimental. Para evaluar IL-6 se utilizó un sistema comercial para cuantificar esta proteína mediante ELISA. Los geles de colágeno tipo I poblados con FGH, en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas', se expusieron durante 48 horas a 3 concentraciones de CHC (50, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y a 10 ng/mL de TGF- β 1. Se utilizaron 10 ng/mL de TNF- α como control positivo de la expresión de IL-6 (figura 11). Se observó una leve disminución en los niveles de IL-6 bajo la condición 'liberada' (figura 11A) frente al estímulo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC. Sin embargo, ninguna de las diferencias resultó ser estadísticamente significativa.

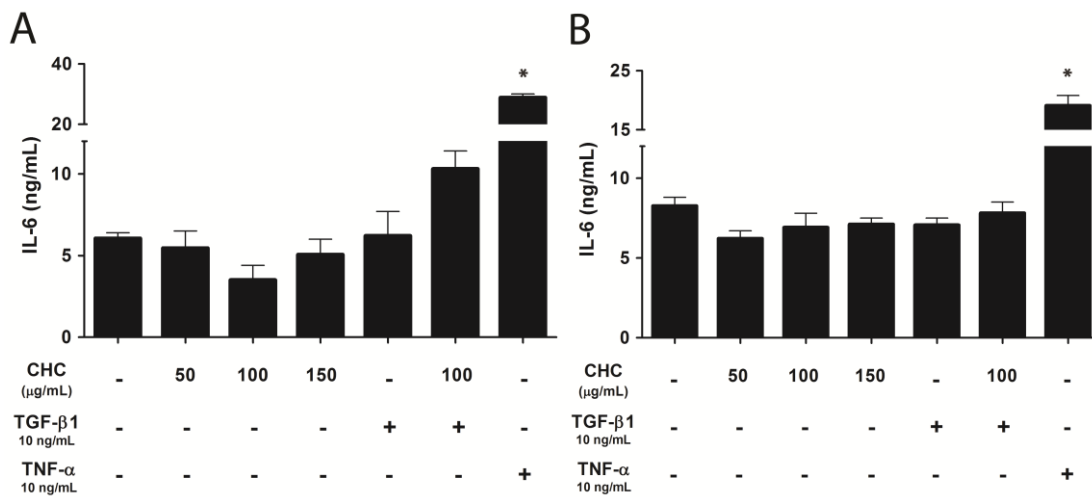


Figura 11. **Efecto del CHC sobre niveles de IL-6 en cultivos 3D de FGH.** FGH cultivados en colágeno I, se incubaron con 50, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC, y 10 ng/mL de TGF- β 1 y TNF- α , en condiciones 'liberadas' (A) y 'tensionadas' (B). Los medios condicionados de estos geles estimulados se analizaron después de 48 horas por medio de un sistema comercial de análisis mediante ELISA. Se realizó un test estadístico ANOVA, post – test Bonferroni, * $p < 0,01$ v/s condición control.

11.8. Efecto del CHC sobre la producción de PGE₂ en cultivos 3D de FGH.

Otro de los blancos moleculares de interés fue PGE₂. Para analizar el efecto del CHC sobre prostaglandina E₂, se evaluaron los niveles de esta proteína con un sistema comercial, mediante la técnica de ELISA. Las muestras analizadas se obtuvieron de los medios condicionados por geles de colágeno tipo I poblados con FGH. Se expusieron los geles de colágeno a 3 concentraciones de CHC (50, 100 y 150 µg/mL), en condiciones 'liberadas' y 'tensionadas' (figura 12). En nuestro modelo, se observó que CHC disminuyó los niveles de PGE₂, tanto en los geles 'liberados' (figura 12A) como en los geles 'tensionados' (figura 12B). Cabe también mencionar que los niveles de PGE₂ encontrados en los geles 'tensionados' fueron considerablemente mayores que en las condiciones 'liberadas'. En la condición control de los geles 'tensionados', la concentración de PGE₂ fue considerablemente mayor que en cualquier otra condición, y no pudo ser detectada ya que se escapaba del rango de detección de este sistema comercial. Este experimento se realizó en duplicado, y por lo tanto es necesario mayores repeticiones para confirmar este resultado.

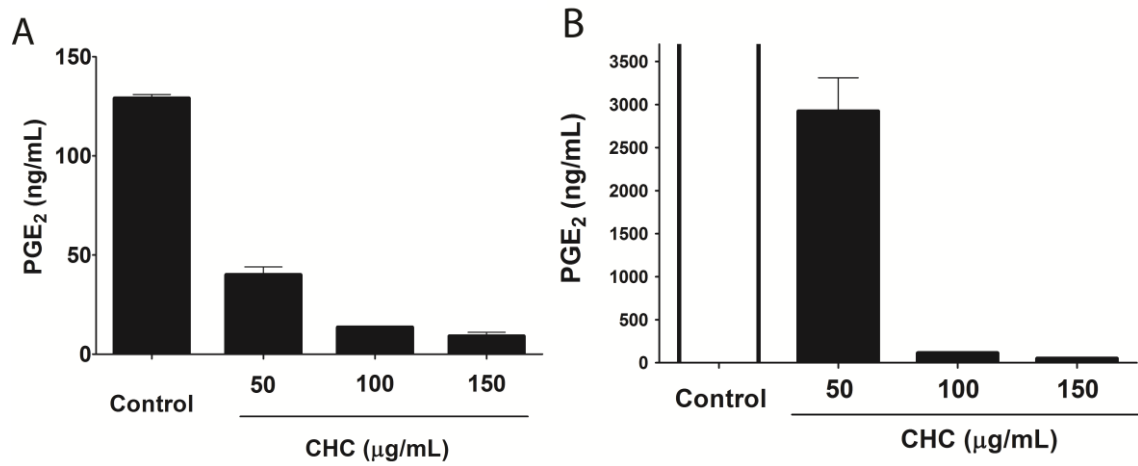


Figura 12. **Efecto del CHC sobre los niveles de PGE₂ en cultivos 3D de FGH.** FGH cultivados en colágeno tipo I se incubaron en condiciones ‘liberadas’ (A) y ‘tensionadas’ (B). Se analizó mediante un sistema comercial (ELISA) los niveles de PGE₂ en nuestro modelo, frente al estímulo con 50, 100 y 150 µg/mL de CHC. Este resultado se obtuvo de un experimento en duplicado.

12. Discusión.

12.1. Efecto del CHC sobre la remodelación de cultivos 3D de FGH.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto del condensado del humo de cigarrillo, sobre los procesos de regeneración y remodelación de FGH, en un modelo de cultivo celular 3D de matrices de colágeno. Esto cumplía con el interés del grupo de trabajo de continuar y ahondar en los estudios referentes a los efectos del tabaquismo sobre la salud periodontal. En la presente memoria comprobamos que el CHC es un potente inhibidor de la contracción de geles de colágeno tipo I poblados por FGH. Por otro lado se analizaron cambios en α -SMA e integrina β 1, proteínas que están involucradas en la contracción y diferenciación de fibroblastos, no observándose cambios significativos en la expresión de estas proteínas. Finalmente se estudió el efecto del CHC sobre los niveles de proteínas implicadas en regular la contracción de fibroblastos y del tejido de granulación durante la reparación de heridas, tales como CTGF, MMP-3, MMP-2, IL-6 y PGE₂. De todas las proteínas analizadas, sólo PGE₂ mostró una reducción en sus niveles tanto en geles 'tensionados' como en 'liberados'. Los resultados de este estudio sugieren que el CHC modifica de manera importante las propiedades de contracción de un modelo 3D del tejido de granulación. Sin embargo, es necesario investigar en forma más específica cuáles son los blancos moleculares afectados por el CHC.

12.2. Cultivo celular y modelo 3D.

Uno de los desafíos importantes de esta memoria, fue implementar un cultivo 3D para todos los análisis celulares, y de esta forma complementar y profundizar los hallazgos obtenidos a partir de modelos de cultivo celular 2D en monocapa. El utilizar un modelo 3D claramente nos acerca a una condición fisiológica en la que se encuentran las células *in vivo*. Sin embargo, esto también impone dificultades metodológicas relacionadas con el análisis de las proteínas y estructuras celulares presentes al interior de los geles. En la literatura existen reportes sobre las diferencias entre el modelo 2D sobre placas de plástico y el 3D en matrices de colágeno (Jones & Ehrlich, 2011; van Beurden *et al.*, 2005). Las mayores diferencias y críticas al modelo 2D en monocapa, se relacionan con la carga mecánica que reciben las células que están en contacto frente al plástico rígido. Esta tensión genera una morfología alargada en las células, con la presencia de fibras de estrés, las cuales no se encuentran en una situación fisiológica *in vivo* (Rhee & Grinnel, 2009; Hinz, 2010). Estas condiciones pueden encontrarse en fibroblastos en procesos reparativos tempranos del tejido de granulación, donde desarrollan estructuras celulares necesarias principalmente para fenómenos de migración. Se utiliza el concepto de proto-miofibroblasto para definir el estado de la célula previo al miofibroblasto completamente diferenciado, y el fenotipo celular que se obtiene en cultivos celulares 2D sobre plástico (Tomasek *et al.*, 2002). De esta forma, el nivel de diferenciación, el fenotipo y la señalización intracelular de los

fibroblastos son sumamente sensibles a la carga mecánica de la matriz o la superficie a la cual están adheridas, por lo que cobra especial importancia el uso de este modelo 3D al estudiar fenómenos relacionados con la remodelación y regeneración de tejidos.

La contracción de geles de colágeno corresponde a una aproximación experimental, entre tantas otras, para evaluar las respuestas celulares relacionadas con procesos de regeneración y remodelación de tejidos. Este modelo es bastante completo, ya que implica la participación de numerosos sistemas celulares en el proceso de contracción de las matrices. En nuestro caso, recurrimos al cultivo 3D de FGH, en el cual es posible observar y confirmar la contracción del modelo 3D, de manera de evaluar la funcionalidad del sistema antes de tomar alícuotas de medio condicionado, o de lisar los geles para analizar niveles de proteínas. Sin embargo, al momento de indagar algunos de los blancos moleculares escogidos como candidatos para medir el efecto del CHC, la mayoría de éstos no se vieron alterados. Está reportado que muchas de estas proteínas candidatas se ven fuertemente moduladas por efecto de diversos productos del humo de cigarrillo como nicotina, condensado y/o extracto de humo de cigarrillo. Esto puede significar que en cultivos y aproximaciones experimentales 2D, los resultados obtenidos no representan de manera fiel el ambiente que rodea a las células y que esas observaciones pueden estar influenciadas por efecto de la placa de cultivo artificial, la inexistencia de matriz extracelular, las limitadas conexiones célula-célula, e

incluso por el fenotipo celular desarrollado por la alta tensión mecánica generada por el plástico. Se puede desprender de esta experiencia que el uso del modelo 3D se acerca mucho más a la realidad fisiológica que experimenta la célula, lo cual le da un gran peso a los resultados.

12.3. Contracción de geles de colágeno tipo I.

En este trabajo se demuestra que CHC afectó la contracción de geles de colágeno I poblados con FGH, bajo el estímulo de SFB (figura 4). A partir de ensayos de viabilidad celular de un trabajo anterior de nuestro laboratorio, se seleccionó el rango de concentraciones de CHC utilizado, que además representan condiciones de exposición al CHC comparables a las que se exponen los tejidos de un individuo fumador crónico (Silva *et al.*, 2012). Por otro lado, se observó que citocalasina D inhibió prácticamente por completo la contracción de las matrices, inducida por SFB 1%. Citocalasina D es una toxina que inhibe la polimerización de fibras de actina (Kustermans *et al.*, 2008), por lo tanto este resultado sugiere que en nuestro modelo, la contracción es dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina. Estudios en los cuales se han utilizado tanto fibroblastos en cultivos 2D y neutrófilos han evidenciado que algunos componentes del humo de cigarrillo pueden afectar los niveles y la polimerización del citoesqueleto y de actina (Wong & Martins-Green, 2004; Ryder *et al.*, 2002). En experimentos futuros esperamos analizar de qué manera

el CHC modifica la organización del citoesqueleto de actina en un microambiente 3D.

El suero fetal bovino induce la contracción de geles de colágeno. No se conoce cuál de los innumerables factores de crecimiento que se encuentran en el suero es el responsable del efecto observado, por esta razón se eligió TGF- β 1 como estímulo para nuestros cultivos, debido a que favorece la contracción de geles, la formación de fibras de estrés y la diferenciación miofibroblástica (Barrientos *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2005). En este estudio se demostró que la contracción de geles de colágeno inducida por TGF- β 1, es inhibida en forma significativa en presencia del CHC. Esto ocurre en geles 'tensionados' y no así en los geles 'liberados', donde no se observaron cambios en los niveles de contracción en ninguna condición (figura 5).

12.4. Diferenciación miofibroblástica.

El fenómeno de contracción está asociado principalmente a un tipo celular conocido como miofibroblasto. Una proteína que identifica a este tipo celular es α -SMA, que corresponde a una isoforma de actina que se puede encontrar también en células de músculo liso. Se analizó la expresión de α -SMA en los geles en los que había ocurrido contracción (geles 'tensionados'), sin embargo no se observan diferencias significativas en los niveles de esta proteína, al comparar las condiciones controles y las estimuladas con TGF- β 1 y CHC (figura 6). Lo anterior confirmó que CHC no altera los niveles de expresión

de α -SMA en la condición 'tensionada', y por lo tanto sugiere que la reducción en la contracción de los geles de colágeno no está asociada al proceso de diferenciación miofibroblástica en nuestro modelo 3D.

Otra observación importante, es que el control positivo de 10 ng/mL de TGF- β 1 (dosis relativamente alta) no logra aumentar los niveles del marcador miofibroblástico α -SMA, como era esperado. Una de las posibles explicaciones sería que TGF- β 1 no es el único factor involucrado en la diferenciación miofibroblástica. Últimamente se ha reportado que participan -y son necesarios- en este proceso proteínas como CTGF, integrinas, fibronectina ED-A, además de la tensión mecánica sobre la célula (van Beurden *et al.*, 2005). En el caso de los geles 'tensionados' usados para analizar la expresión de α -SMA, nos queda la duda de si se logró la carga mecánica suficiente para diferenciar los fibroblastos a miofibroblastos. Es importante destacar que en cultivo 2D de FGH, una concentración de 100 μ g/mL de CHC redujo significativamente los niveles de α -SMA inducidos por TGF- β 1 (Silva *et al.*, 2012). Por otro lado, en la literatura se reportan trabajos donde utilizan geles de colágeno como modelo de cultivo 3D, y en los que analizan también la expresión de marcadores como α -SMA e integrina β 1. Nos llama la atención que algunos protocolos incluyen diferentes etapas de cultivo en monocapa en placas 2D, previo al cultivo en las matrices 3D de colágeno. En primera instancia, crecen los fibroblastos en placas de cultivo plásticas, seguido de dos días en ausencia de suero y

posteriormente, los exponen frente al estímulo TGF- β 1 por tres días, en la misma placa en 2D. Finalmente, separan los fibroblastos de la placa plástica y los siembran en soluciones de colágeno I (Arora *et al.*, 1999).

12.5. CTGF.

Algunos estudios indican que fibroblastos gingivales responden menos a TGF- β 1 que fibroblastos de piel, todo a partir de muestras humanas (Shannon *et al.*, 2006). Estos análisis generalmente buscan explicar la observación de que los tejidos orales reparan mejor y producen menos cicatrices que otros tejidos (Guo *et al.*, 2011). Sin embargo, los datos de estos trabajos pueden dar luces del por qué nuestros fibroblastos gingivales no ven alterados los niveles de diversos blancos moleculares frente al estímulo de TGF- β 1, especialmente en nuestro modelo 3D en colágeno.

En el mismo contexto, al revisar los niveles de producción de CTGF por FGH, en nuestro modelo se observó que no hubo variaciones frente a los estímulos de CHC y TGF- β 1. Sin embargo, es interesante comparar los diferentes niveles de CTGF en las condiciones 'liberadas' y 'tensionadas' (figura 8 A y B). CTGF es una proteína que se induce durante los procesos de fibrogénesis y reparación, como también por efecto de TGF- β 1 (Leask & Abraham, 2006; Yang *et al.*, 2008). En nuestro modelo, el estímulo con TGF- β 1 no produjo modificaciones en los niveles de CTGF, pero la variación en la tensión de los geles produjo una expresión diferencial del factor de crecimiento.

Comparando las condiciones control en geles 'liberados' y 'tensionados', se observaron menores niveles de la proteína en la situación sin carga mecánica. Esto da cuenta que la expresión de CTGF es sensible a la tensión mecánica experimentada por FGH en nuestro modelo.

12.6. PGE₂.

Los niveles de PGE₂ se vieron drásticamente disminuidos en nuestro modelo por el efecto del CHC (figura 12). Es interesante notar que los niveles de producción de PGE₂ en los geles 'tensionados' son tan altos, que no se pueden analizar por estar fuera del rango de detección del sistema comercial de ELISA. Esto quiere decir que los niveles de PGE₂ secretados por FGH son extremadamente sensibles a la carga mecánica de la matriz que los rodea. De alguna manera, estos resultados se ajustan y complementan las observaciones de otros investigadores que describen que fibroblastos de pulmón humanos disminuyen sus niveles de PGE₂ bajo el efecto de extracto de humo de cigarrillo (Wang *et al.*, 2003). Sin embargo, es totalmente contrario a lo observado en fibroblastos de pulmón fetal humano, donde los niveles de PGE₂ se ven elevados frente a la exposición a extracto de humo de cigarrillo (Martey *et al.*, 2004). Es de interés destacar un estudio en el que utilizan los mismos fibroblastos de pulmón fetal humano en un cultivo 3D, en el cual se observa que PGE₂ reduce la contracción de geles de colágeno (Zhu *et al.*, 2001). Esto demuestra que se necesita más investigación para confirmar nuestro resultado,

para analizar las vías implicadas y si existe una relación entre la reducción en la contracción de geles de colágeno y los menores niveles de PGE₂, por efecto del CHC en un modelo 3D de FGH.

12.7. Conclusiones y proyecciones.

A modo de conclusión, el CHC disminuye de manera importante la capacidad contráctil de FGH cultivados en geles de colágeno, como también reduce considerablemente los niveles de PGE₂ secretados por fibroblastos, siendo ambos altamente dependientes de la tensión mecánica que se ejerce desde la matriz hacia la célula. En este mismo ámbito, la carga mecánica también afecta los niveles de CTGF, los cuales no se modificaron por efecto del CHC, pero sí fueron considerablemente superiores en FGH cultivados en geles 'tensionados', comparados con la condición 'liberada'. En nuestro modelo no se observaron cambios a nivel de otras proteínas afectadas por productos del humo de cigarrillo, en modelo 2D. Estos resultados sugieren que CHC afecta los procesos celulares relacionados con la reparación y regeneración de tejidos.

Como proyección inmediata de este trabajo, la intención del grupo es confirmar los resultados de PGE₂, para obtener un análisis estadístico del efecto del CHC sobre los niveles de esta proteína. También sería interesante indagar de manera más profunda los efectos del CHC sobre el citoesqueleto de actina, y su implicancia en los fenómenos de contracción. Por otro lado, para comprender y caracterizar de mejor manera el ambiente 3D que experimentan

las células, el efecto de la tensión mecánica y del CHC sobre FGH, podría ser de utilidad analizar cómo se modulan los niveles y activación de TGF- β 1, citoquina determinante en este proceso. De esta forma, se podría obtener un panorama más preciso de lo que sucede en nuestro modelo 3D, y así descubrir posibles nuevos blancos moleculares del CHC, y los mecanismos por los cuales afecta la fisiología periodontal.

13. Conclusiones.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del condensado de humo de cigarrillo sobre la remodelación de fibroblastos gingivales humanos en cultivos tridimensionales. Las conclusiones de esta memoria son:

- 100 $\mu\text{g/mL}$ de CHC disminuye considerablemente la contracción de geles de colágeno I poblados con FGH.
- CHC reduce los niveles de PGE_2 secretados por fibroblastos gingivales en un cultivo 3D.
- La tensión mecánica presente en la matriz extracelular modula los niveles de CTGF y PGE_2 , siendo superiores los niveles de estas proteínas en condiciones de alta carga mecánica (geles 'tensionados').
- Finalmente, el CHC no altera los niveles de diversos blancos moleculares en el modelo 3D de FGH, aun cuando algunos de ellos son modulados por diversos productos del humo de cigarrillo en cultivos en 2D. Las proteínas que no modificaron sus niveles frente al

estímulo del CHC fueron α -SMA, integrina β 1, MMP-2, MMP-3, CTGF e IL-6.

Los resultados de esta memoria sugieren que el CHC altera las propiedades de contracción de un modelo 3D del tejido de granulación. Sin embargo, es necesario investigar en forma más específica las proteínas aquí estudiadas, como también indagar sobre posibles nuevos blancos moleculares afectados por el CHC.

Este estudio establece una base para continuar en el estudio del efecto del tabaquismo sobre salud periodontal. También presenta el uso de un modelo 3D, mediante el cual se obtuvieron resultados disímiles a los observados en trabajos con cultivos 2D. Se propone que este es un modelo de estudio más completo y cercano a la realidad fisiológica celular, que el modelo 2D.

14. Referencias.

Arora PD, Narani N, McCulloch CA. 1999. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol.* 154(3):871-82.

Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:381-410.

Austin GW, Cuenin MF, Hokett SD, Peacock ME, Sutherland DE, Erbland JF, Billman MA. 2001. Effect of nicotine on fibroblast beta 1 integrin expression and distribution *in vitro*. *J Periodontol.* 72(4):438-44.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16(5):585-601.

Bartold PM, Narayanan AS. 2006. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 40(1):29-49.

Black SA Jr, Palamakumbura AH, Stan M, Trackman PC. 2007. Tissue-specific mechanisms for CCN2/CTGF persistence in fibrotic gingiva: interactions between cAMP and MAPK signaling pathways, and prostaglandin E2-EP3 receptor mediated activation of the c-JUN N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 282(21):15416-29.

Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ. 1999. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg.* 230(2):260-5.

Bulmanski Z, Brady M, Stoute D, Lallier TE. 2012. Cigarette smoke extract induces select matrix metalloproteinases and integrin expression in periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 83(6):787-96.

Buscemi L, Ramonet D, Klingberg F, Formey A, Smith-Clerc J, Meister JJ, Hinz B. 2011. The single-molecule mechanics of the latent TGF- β 1 complex. *Curr Biol.* 21(24):2046-54.

Chang YC, Hsieh YS, Lii CK, Huang FM, Tai KW, Chou MY. 2003. Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J Periodontal Res.* 38(1):44-50.

Chang HH, Wu CB, Chen YJ, Weng CY, Wong WP, Chen YJ, Chang BE, Chen MH, Yao CC. 2008. MMP-3 response to compressive forces *in vitro* and *in vivo*. *J Dent Res.* 87(7):692-6.

Cicha I, Goppelt-Struebe M. 2009. Connective tissue growth factor: context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors*. 35(2):200-8.

Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. 2001. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci*. 114(18):3285-96.

Elsdale T, Bard J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 54(3):626-37.

Gallucci RM, Lee EG, Tomasek JJ. 2006. IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *J Invest Dermatol*. 126(3):561-8.

Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W, Carvajal P, Arteaga O. 2010. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*. 81(10):1403-10.

Gao S, Chen K, Zhao Y, Rich CB, Chen L, Li SJ, Toselli P, Stone P, Li W. 2006. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts. *Toxicol Sci*. 87(1):197-203.

Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT. 2004. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45(4):1109-16.

González R, Arancibia R, Cáceres M, Martínez J, Smith PC. 2009. Cigarette smoke condensate stimulates urokinase production through the generation of reactive oxygen species and activation of the mitogen activated protein kinase pathways in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 44(3):386-94.

Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. 2000. Models for use in wound healing research: a survey focusing on *in vitro* and *in vivo* adult soft tissue. *Wound Repair Regen*. 8(2):83-96.

Grinnell F, Ho CH, Lin YC, Skuta G. 1999. Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating *versus* stressed collagen matrices. *J Biol Chem*. 274(2):918-23.

Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. 1996. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ*. 7(4):469-80.

Guo F, Carter DE, Mukhopadhyay A, Leask A. 2011. Gingival fibroblasts display reduced adhesion and spreading on extracellular matrix: a possible basis for scarless tissue repair? PLoS One. 6(11):e27097.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. Nature. 453(7193):314-21.

Hinz B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J Invest Dermatol. 127(3):526-37.

Hinz B. 2010. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. J Biomech. 43(1):146-55.

Johnson GK, Hill M. 2004. Cigarette smoking and the periodontal patient. J Periodontol. 75(2):196-209.

Jones C, Ehrlich HP. 2011. Fibroblast expression of α -smooth muscle actin, $\alpha 2\beta 1$ integrin and $\alpha v\beta 3$ integrin: influence of surface rigidity. Exp Mol Pathol. 91(1):394-9.

Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Kitami S, Morita T, Motohashi M, Maeno M. 2009. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. Arch Oral Biol. 54(2):146-55.

Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. 2001. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 281(5):L1257-63.

Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. 2003. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition *via* E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. Am J Respir Cell Mol Biol. 29(5):537-44.

Kobayashi T, Liu X, Kim HJ, Kohyama T, Wen FQ, Abe S, Fang Q, Zhu YK, Spurzem JR, Bitterman P, Rennard SI. 2005. TGF-beta1 and serum both stimulate contraction but differentially affect apoptosis in 3D collagen gels. Respir Res. 6:141.

Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. 2011. The CCN family: a new class of inflammation modulators? Biochimie. 93(3):377-88.

Kustermans G, Piette J, Legrand-Poels S. 2008. Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction. *Biochem Pharmacol.* 76(11):1310-22.

La Rocca G, Anzalone R, Magno F, Farina F, Cappello F, Zummo G. 2007. Cigarette smoke exposure inhibits extracellular MMP-2 (gelatinase A) activity in human lung fibroblasts. *Respir Res.* 8:23.

Larjava H, Heino J, Kähäri VM, Krusius T, Vuorio E. 1989. Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. *J Dent Res.* 68(1):20-5.

Leask A, Abraham DJ. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18(7):816-27.

Leask A, Abraham DJ. 2006. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci.* 119(23):4803-10.

Lechapt-Zalcman E, Prulière-Escabasse V, Advenier D, Galiacy S, Charrière-Bertrand C, Coste A, Harf A, d'Ortho MP, Escudier E. 2006. Transforming growth factor-beta1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(6):L1277-82.

Martin P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276(5309):75-81.

Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KM, Baglole CJ, Phipps RP, Sime PJ. 2004. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(5):L981-91.

Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. 2009. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 4(1):13-22.

Ministerio de Salud. 2011. Encuesta Nacional de Salud ENS Chile 2009-2010. <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf>. Consulta: 6 agosto 2012.

Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM. 2007. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity *via* EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36(4):480-90.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275(29):21785-8.

Rhee S, Grinnell F. 2007. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev.* 59(13):1299-305.

Rota MT, Poggi P, Boratto R. 2001. Human gingival fibroblast cytoskeleton is a target for volatile smoke components. *J Periodontol.* 72(6):709-13.

Ryder MI, Wu TC, Kallaos SS, Hyun W. 2002. Alterations of neutrophil f-actin kinetics by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 37(4):286-92.

Semlali A, Chakir J, Rouabhia M. 2011. Effects of whole cigarette smoke on human gingival fibroblast adhesion, growth, and migration. *J Toxicol Environ Health A.* 74(13):848-62.

Shannon DB, McKeown ST, Lundy FT, Irwin CR. 2006. Phenotypic differences between oral and skin fibroblasts in wound contraction and growth factor expression. *Wound Repair Regen.* 14(2):172-8.

Shizu M, Itoh Y, Sunahara R, Chujo S, Hayashi H, Ide Y, Takii T, Koshiko M, Chung SW, Hayakawa K, Miyazawa K, Hirose K, Onozaki K. 2008. Cigarette smoke condensate upregulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocyte line. *J Interferon Cytokine Res.* 28(8):509-21.

Silva D, Cáceres M, Arancibia R, Martínez C, Martínez J, Smith PC. 2012. Effects of cigarette smoke and nicotine on cell viability, migration and myofibroblastic differentiation. *J Periodontal Res.* doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01483.x

Singer AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341(10):738-46.

Snyder HB, Caughman G, Lewis J, Billman MA, Schuster G. 2002. Nicotine modulation of *in vitro* human gingival fibroblast beta1 integrin expression. *J Periodontol.* 73(5):505-10.

Stephens P, Davies KJ, Occleston N, Pleass RD, Kon C, Daniels J, Khaw PT, Thomas DW. 2001. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br J Dermatol.* 144(2):229-37.

Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516.

- Takeuchi H, Kubota S, Murakashi E, Zhou Y, Endo K, Ng PS, Takigawa M, Numabe Y. 2010. Nicotine-induced CCN2: from smoking to periodontal fibrosis. *J Dent Res.* 89(1):34-9.
- Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. 2011. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health.* 8(2):613-28.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(5):349-63.
- van Beurden HE, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. 2005. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res.* 84(10):871-80.
- Wang H, Liu X, Umino T, Kohyama T, Zhu YK, Wen FQ, Spurzem JR, Romberger DJ, Kim HJ, Rennard SI. 2003. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(1):L205-13.
- Wang RD, Wright JL, Churg A. 2005. Transforming growth factor-beta1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33(4):387-93.
- Werner S, Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 83(3):835-70.
- Wong LS, Martins-Green M. 2004. Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair Regen.* 12(4):471-84.
- Worthington JJ, Klementowicz JE, Travis MA. 2011. TGF β : a sleeping giant awoken by integrins. *Trends Biochem Sci.* 36(1):47-54.
- Yang R, Amir J, Liu H, Chaqour B. 2008. Mechanical strain activates a program of genes functionally involved in paracrine signaling of angiogenesis. *Physiol Genomics.* 36(1):1-14.
- Zhang W, Song F, Windsor LJ. 2009. Cigarette smoke condensate affects the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 44(6):704-13.

Zhang W, Fang M, Song F, Windsor LJ. 2011. Effects of cigarette smoke condensate and nicotine on human gingival fibroblast-mediated collagen degradation. *J Periodontol.* 82(7):1071-9.

Zhu YK, Liu XD, Sköld MC, Umino T, Wang H, Romberger DJ, Spurzem JR, Kohyama T, Wen FQ, Rennard SI. 2001. Cytokine inhibition of fibroblast-induced gel contraction is mediated by PGE(2) and NO acting through separate parallel pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25(2):245-53.

15. Anexos.

15.1. Documento de consentimiento informado del paciente donante de tejido.

Documento de Consentimiento Informado (donantes de tejido):

Título del proyecto de Investigación: "Reparación tisular en los tejidos periodontales humanos: Modulación por tabaquismo y factores de crecimiento".

Investigador Responsable: Dr. Patricio Smith Ferrer, Profesor Asistente Ordinario, Carrera de Odontología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar -o no- en una investigación médica.

Objetivo de la investigación: el objetivo de esta investigación es analizar de qué manera factores de riesgo como el tabaquismo o citoquinas pro-inflamatorias secretadas en la EP podrían retardar el proceso de reparación periodontal.

Procedimiento de la investigación: Se me ha solicitado participar voluntariamente en este estudio que investigará los efectos del tabaquismo o citoquinas pro-inflamatorias sobre la cicatrización de heridas en las encías. Esta invitación se generó luego que mi odontólogo tratante, que no forma parte del equipo de investigadores de este estudio, me indicara la conveniencia de extraer los terceros molares. Yo acepto voluntariamente donar el tejido gingival que es eliminado rutinariamente durante la extracción de terceros molares para obtener células que serán usadas en este estudio y que serán cultivadas y congeladas. Si en el futuro esta muestra es utilizada con otro fin, se me solicitará mi consentimiento. Esta muestra de tejido y las células obtenidas a partir del mismo serán almacenadas por un periodo máximo de 4 años, bajo la responsabilidad del Laboratorio de Fisiología Periodontal del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la UC.

Beneficios: No obtendré beneficios directos por participar en este estudio. Sin embargo, la información obtenida por este estudio podría ser de utilidad para conocer más acerca de la capacidad de regeneración de las encías y tejidos periodontales y podría ayudar así a otras personas.

Riesgos: Los riesgos de estos procedimientos son mínimos y corresponden a los generados por la extracción de los terceros molares que mi odontólogo indica que es indispensable realizar y los cuales me ha explicado previamente. Por lo tanto esta investigación no generará riesgos adicionales.

Costos: Su participación no tiene costos para usted.

Compensaciones: No recibiré ninguna compensación económica al donar mis terceros molares a este estudio.

Confidencialidad de la información: Los resultados de este estudio me serán informados si yo lo solicito y pueden ser publicados en revistas médicas y/o presentados en conferencias

científicas, pero mi nombre o identidad no será revelada y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial de acuerdo a la reglamentación vigente, a menos que mi identidad sea solicitada por ley por los tribunales de justicia respectivos. Yo podré retirarme de este estudio en cualquier momento sin dar razones ni tampoco sin que esto modifique la calidad de la atención odontológica que recibiré. Si retiro mi consentimiento, mis muestras serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada. En caso que no desee participar en este estudio, esto no afectará la calidad o tipo de tratamiento por el cual consulté.

Preguntas: Cualquier pregunta que yo quiera hacer en relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por el Dr. Patricio Smith Ferrer en el Centro de Investigaciones Médicas, Carrera de Odontología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Marcoleta 391 o escribir al mail psmith@med.puc.cl.

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede llamar al Dr. Eduardo Guarda S., Presidente del Comité de Ética en Investigación de la Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al teléfono 354-8173, o al mail: etica.investigacion@med.puc.cl.

Este consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado(a) u obligado(a) en forma alguna. Se me han explicado claramente los propósitos de la investigación, procedimientos, riesgos, beneficios y derechos que me asisten.

Se me dará una copia firmada de este documento.

NOMBRE PACIENTE


FECHA Y FIRMA

FECHA Y FIRMA
Dr. Patricio Smith Ferrer
INVESTIGADOR RESPONSABLE

DIRECTOR DE LA INSTITUCIÓN

FECHA Y FIRMA

15.2. Certificados de aprobación de proyecto del comité de bioética.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE MEDICINA
Dirección de Investigación

ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO FONDECYT REGULAR 2009.

1.- Miembros del Comité de Ética de la Dirección de Investigación presentes en la aprobación del Proyecto:

Dra. Sandra Braun Jones
Médico Cirujano, Profesor Adjunto de Medicina, Secretaria Ejecutiva del Comité

Dra. Beatríz Shand Klagges.
Médico Cirujano, Instructor Asociado de Medicina.

Sr. Jorge Muñoz Castillo
Abogado, miembro externo de la Universidad

Dr. Gastón Chamorro Spikin
Médico Cirujano, Profesor Titular de Medicina

Dr. Gustavo Kaltwasser González.
Médico Cirujano, miembro externo a la Universidad

Dr. Hernán Muñoz Letelier
Médico Cirujano, Profesor Adjunto de Medicina

2.- Fecha de aprobación: Jueves 17 de Julio de 2008.

3.- Título del Proyecto: “Reparación tisular en los tejidos periodontales humanos: modulación por tabaquismo y factores de crecimiento”.

4.- Investigador Responsable: Dr. Patricio Smith Ferrer.

5.- Institución: Pontificia Universidad Católica de Chile.

6.- Documentación revisada:

- **Proyecto de Investigación titulado** “Reparación tisular en los tejidos periodontales humanos: modulación por tabaquismo y factores de crecimiento”.
- **Consentimientos Informados** del Proyecto: “Reparación tisular en los tejidos periodontales humanos: modulación por tabaquismo y factores de crecimiento”. El proyecto en referencia contempla cuatro formularios de Consentimientos Informados, para cuatro procedimientos diferentes a ser ejecutados en el proyecto en referencia.




UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DECANATO

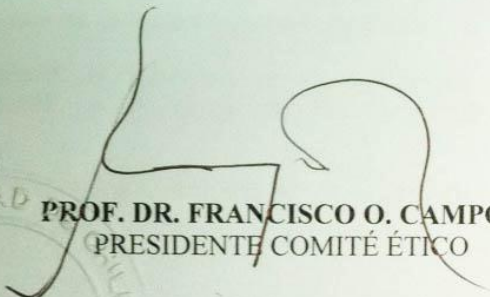
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

El Comité de Ética de la Facultad de Odontología, luego de aclarados los aspectos de los consentimientos informados del proyecto 1090142, otorga la aprobación de los mismos, cuyo Investigador Responsable es el Académico Prof. Dr. PATRICIO SMITH FERRER, de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Medicina.

Se extiende el presente documento para ser presentado al Comité Asesor de Bioética de FONDECYT.

SANTIAGO, 01 de junio de 2009.


PROF. DRA. MARIA A. TORRES V.
SECRETARÍA EJECUTIVA


PROF. DR. FRANCISCO O. CAMPOS S.
PRESIDENTE COMITÉ ÉTICO

FOCS/vrd.

