



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Escuela de Graduados

**CARACTERIZACION DE LAS RESPUESTAS BIOLÓGICAS
INDUCIDAS POR EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS DURANTE LA
REPARACIÓN TISULAR**

Tesis para optar el título de Doctor en Farmacología de
Mónica Andrea Cáceres Lluch

Directores de tesis:
Patricio Smith (Lab Fisiología Periodontal, carrera de Odontología.
Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica

Jorge Martínez (Lab Biología Celular. INTA. Universidad de Chile)

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V

INTRODUCCIÓN.....	1
Reparación tisular.....	1
Fases de la reparación tisular.....	2
Participación de miofibroblastos en la reparación tisular.....	2
Características de fenotipo miofibroblástico.....	
Matriz extracelular de la herida en reparación.....	3
Citoesqueleto y remodelación de la herida en reparación.....	5
Rho, fibras de estrés y adhesiones focales.....	6
Modelo de geles de colágeno para el estudio de la contracción del tejido de granulación.....	6
MMPs y remodelación de tejidos.....	7
Factores de crecimiento derivados de plaquetas.....	8
Modelo experimental.....	10
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	12

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos y equipos.....	14
Materiales.....	14

Métodos

1. Almacenamiento y Cultivo de fibroblastos de encía.....	16
2. Plasma rico en plaquetas (PRP) y Plasma Pobre en Plaquetas (PPP).....	16
3. Western-blot.....	17
4. Pull down.....	18

5. ELISA para TGFβ1.....	18
6. Inmunofluorescencia.....	19
7. Cultivo tridimensional de células ó Geles de contracción de colágeno.....	19
8. Migración en nido.....	20
9. Migración desde explantes.....	21
10. Migración en insertos bicamerales tipo Transwell.....	21
11. Extracción de RNA total desde monocapas de fibroblastos Gingivales.....	21

RESULTADOS

Obtención del PRP y PPP de donantes humanos.....	23
I. Efecto del PRP y PPP sobre la contracción de geles de colágeno.....	24
I.1 Contracción en geles de colágeno.....	24
I.2 Efectos de PRP y PPP sobre los niveles MT1-MMP y TIMP-2..	26
I.3 Efecto del PRP y PPP sobre la activación de la GTPasa RhoA, la polimerización del citoesqueleto de actina y formación de contactos de adhesión focal.....	28
II. Expresión de marcadores de diferenciación	
II.1 Actina muscular alfa (α-SMA).....	31
II.2 Fibronectina ED-A.....	32
II.3 Colágeno tipo I.....	34
II.4 Periostina.....	36
Presencia de moléculas en estudio en PPP y PRP.....	37
Expresión de mRNA para α-SMA y TIMP-2.....	38
III. Migración.	
III.1 Ensayo de migración desde explantes de tejido gingival.....	39
III.2 Ensayo de migración celular en matrices tipo nido.....	

III.3 Ensayo de invasión en sistema bicameral (Transwell).....	41
IV Papel de TGFβ1 en las respuestas celulares inducidas por PPP y PRP	
IV.1 Niveles de TGF-β1 presentes en PRP y PPP.....	42
IV.2 Papel de TGF-β1 presente en PRP y PPP en la expresión de α-SMA y FN-EDA.....	43
IV.3 Efectos de PRP y PPP sobre la activación de la ruta Smad 2,3.....	45
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Migración de los fibroblastos desde los márgenes de la herida.

Figura 2. Mecanismo de activación de Rho.

Figura 3 Tejidos periodontales.

Figura 4. Formación del coagulo en PPP y PRP.

Figura 5. Efectos de PPP y PRP en la contracción de geles de colágeno

Figura 6. Iloprost y Citocalasina D inhiben la contracción de geles de colágeno inducida por PRP y PPP.

Figura 7. Efectos de PRP y PPP sobre los niveles de MT1-MMP

Figura 8. Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de TIMP-2 en fibroblastos gingivales humanos

Figura 9. Efecto de PRP y PPP sobre la activación de la GTPasa RhoA

Figura 10. Efectos de PRP y PPP sobre la formación de fibras de actina y contactos de adhesión focal.

Figura 11. Localización de proteínas fosforiladas en tirosina

Figura 12. Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de α -SMA.

Figura 13. Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de Fibronectina ED-A en fibroblastos gingivales.

Figura 14. Localización de FN-ED-A en células tratadas con PPP y PRP.

Figura 15. Efecto de PRP y PPP sobre los niveles de colágeno tipo I en fibroblastos gingivales

Figura 16. Efectos de PPP y PRP sobre los niveles y localización de HSP-47.

Figura 17 . Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de Periostina.

Figura 18. Expresión de Col tipo I, TIMP-2 y actina en los PRP y PPP.

Figura 19. PRP y PPP inducen la expresión de mRNA de α -SMA y TIMP-2

Figura 20. Efectos de PPP y PRP sobre la migración de fibroblastos desde explantes de tejido gingival.

Figura 21. Efectos de PPP y PRP sobre la migración celular en ensayos tipo nido.

Figura 22. Efecto de PRP y PPP sobre la invasión y migración de fibroblastos gingivales humanos.

Figura 23. Niveles de TGF β 1 en PRP y PPP.

Figura 24. Efecto del inhibidor de TBRI (SB 431542) sobre los niveles de α -SMA.

Figura 25. Efecto del inhibidor de activina – folistatina- sobre los niveles de los marcadores de miofibroblastos α -SMA y FN-EDA.

Figura 26. Efecto de PPP y PRP sobre la fosforilación de la vía Smad 2,3.

Lista de Abreviaturas

AA	: Acido Araquidónico
α -SMA	: Actina muscular alfa
α -MEM	: Medio esencial mínimo alpha
BSA	: Albumina de suero bovino
Col tipo I	: Colágeno tipo I
DMSO	: Dimetil sulfóxido
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
Hrs	: Horas
GST	: Glutation S Transferasa
IPTG	: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MEC	: Matriz extracelular
MT-MMP	: Metaloproteinasa de membrana tipo I
PBS	: Amortiguador fosfato salino
PCR	: Reacción de polimerización en cadena
PMSF	: Fenil metil sulfonil fluoruro
PRP	: Plasma rico en plaquetas
PPP	: Plasma pobre en plaquetas
RNA	: Acido ribonucleico
mRNA	: RNA mensajero
rRNA	: RNA ribosomal
Rpm	: Revoluciones por minutos
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFB	: Suero fetal bovino
TIMP-2	: Inhibidor tisular de metaloproteinasa 2
TGF β 1	: Factor de crecimiento transformante β 1

RESUMEN

Se ha propuesto el empleo de factores solubles derivados de plaquetas con el objeto de promover la reparación de tejidos. A pesar que diversos estudios han evaluado la respuesta de células gingivales y periodontales a fracciones derivadas de plaquetas, existe un fuerte debate acerca de los efectos ejercidos por estos factores sobre respuestas celulares relacionadas con la reparación tisular. En la presente tesis hemos evaluado la respuesta de cultivos primarios de fibroblastos gingivales de origen humano (FG) estimulados con Plasma rico (PRP) y pobre en plaquetas (PPP). Se evaluaron diferentes respuestas celulares que incluyen la contracción de geles de colágeno, migración celular, diferenciación miofibroblástica, producción de moléculas de matriz extracelular (MEC) y de enzimas proteolíticas. Para la contracción de geles se utilizaron cultivos tridimensionales de fibroblastos incorporados en colágeno en presencia de inhibidores de metaloproteasas de matriz y de la polimerización de actina. La producción de moléculas de matriz y de proteasas fue evaluada mediante Western-blot. La actividad de la GTPasa RhoA fue evaluada mediante un ensayo de "pull-down". La distribución de actina y de contactos focales fue analizada mediante inmunofluorescencia. Los niveles de TGF-beta1 fueron cuantificados mediante ELISA.

Tanto el PRP como PPP estimularon la contracción de geles de colágeno, proceso que fue revertido por los inhibidores de MMPs y de la polimerización de actina. PRP y PPP estimularon los niveles de MT1-MMP y TIMP-2, la activación de RhoA y la remodelación del citoesqueleto de actina. Ambas formulaciones estimularon la migración celular evaluado mediante tres ensayos funcionales tales como la migración desde explantes de tejido gingival, la migración en nido y en sistemas bi-camerales. PRP y PPP estimularon la diferenciación miofibroblástica, medida a través de la producción de α -SMA, Fibronectina EDA, colágeno tipo I y periostina. A pesar que TGF-beta1 se encontró más concentrado en PRP en comparación con PPP, la vía de señalización Smad fue similarmente activada por ambos preparados.

El presente estudio muestra que los factores solubles derivados de PRP y PPP pueden ejercer respuestas celulares similares compatibles con la promoción de la reparación tisular gingival. Más aun, estos resultados sugieren que PPP podría tener una acción terapéutica que debería ser estudiada en el futuro.

ABSTRACT

Platelet derived soluble factors have been proposed as a therapeutic agent to promote tissue repair. Although several studies have assessed the response of gingival and periodontal cells to platelet derived fractions, there still strong debate about the specific role played by these agents on cell responses involved in wound healing. In the present thesis we have evaluated the response of primary cultures of human gingival fibroblasts (GF) stimulated with Platelet rich (PRP) and poor plasma (PPP). Different cells responses including collagen matrix contraction, cell migration, myofibroblastic differentiation, production of matrix molecules and proteolytic enzymes were evaluated. Collagen matrix contraction was assessed using fibroblasts-populated collagen lattices in the presence of matrix metalloproteinases and actin polymerization inhibitors. Production of matrix molecules and proteinases was assessed through Western-blot. RhoA activity was evaluated by means of a pull-down assay. Actin distribution and focal adhesions were assessed through immunofluorescence. TGF-beta1 levels were quantified through ELISA. Both PRP and PPP stimulated gingival fibroblasts-populated collagen gel contraction. Moreover, Ilomastat and cytochalasin D inhibited this response. PRP and PPP stimulated MT1-MMP and TIMP-2 production, RhoA activation and actin cytoskeleton remodeling. Both formulations stimulated cell migration as assessed through gingival tissue explants immersed within collagen gels, nested cell migration assays and Transwell migration experiments. PRP and PPP stimulated myofibroblastic differentiation determined through α -SMA, EDA-FN, type I collagen and periostin production. Although TGF-beta1 was more concentrated in PRP when compared to PPP, the Smad pathway was similarly activated by both formulations. The present study shows that soluble factors derived from PRP and PPP may exert a similar cellular response compatible with the promotion of wound remodeling in gingival fibroblasts. Moreover, our results suggest that PPP may be studied as a useful therapeutic agent to modulate gingival tissue healing.

INTRODUCCION

Reparación tisular

La respuesta reparativa es un fenómeno altamente estereotipado y conservado en la naturaleza que permite proteger a los seres vivos de noxas o agentes injuriantes y facilita la restitución de los tejidos dañados. Este proceso comienza con la formación de un coágulo de fibrina que provee una matriz provisional sobre la cual las células migran durante el proceso reparativo. Dicho coágulo consiste en una población de plaquetas inmersas en una malla de fibrina junto con pequeñas cantidades de fibronectina, vitronectina y trombospondina plasmáticas. Es importante destacar, que este coágulo sirve como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento que son liberados cuando las plaquetas degranulan (Martin, 1997). Considerando el papel crucial que juegan las plaquetas en la fase inicial de la reparación es que se han desarrollado estrategias terapéuticas que utilizan concentrados de factores de origen plaquetario, conocidos como Plasma Rico en Plaquetas, Plasma rico en plaquetas y leucocitos, Fibrina rica en plaquetas, Fibrina rica en leucocitos y plaquetas ricas (Dohan et al, 2009) con el propósito de promover la reparación de tejidos.

El proceso de reparación involucra una serie de fases que incluyen una *i*) respuesta inflamatoria, *ii*) la formación de tejido de granulación y *iii*) remodelación de tejido cicatrizal. La transición hacia la formación del tejido de granulación comienza con la migración de fibroblastos desde los márgenes de la herida (Figura 1) y el cierre del componente epitelial a nivel superficial. Las células mesenquimales de la herida en reparación cumplen un papel fundamental, ya que participan en la síntesis de las especies moleculares que forman el tejido de granulación (Schaffer & Nanney, 1996, Golberg et al, 2007).

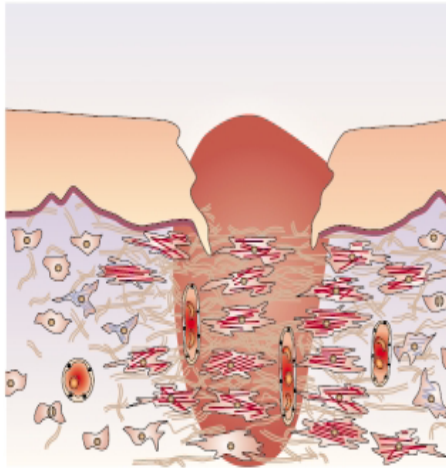


Figura 1: Migración de fibroblastos desde los márgenes de la herida hacia el coágulo y su diferenciación a miofibroblastos (Tomasek et al, 2002).

Fases de la Reparación (Tsirogianni et al, 2006):

Coagulación:

Formación coágulo de fibrina, activación vía AA



Inflamación: Producción de citoquinas, migración neutrófilos y monocitos. Activación macrófagos



Formación tejido de granulación: Comienza con la migración de fibroblastos, proliferación y expresión de MEC. Proliferación células endoteliales y Angiogenesis.



Remodelación: Degradación proteolítica de la MEC y reestructuración

Participación de miofibroblastos en la reparación tisular.

Es un hecho aceptado que la diferenciación de fibroblasto al fenotipo miofibroblástico representa un evento clave durante la reparación tisular. La gran fuerza contráctil generada por los miofibroblastos es beneficiosa para la fisiología de la remodelación tisular. En este sentido se ha propuesto que los miofibroblastos del tejido de granulación facilitan la contracción de la herida y la reducción de su volumen gracias a que estas células pueden contraer su citoesqueleto y remodelar de esta manera el tejido (Häkkinen

et al, 2000). Los miofibroblastos participan además secretando una serie de componentes de la MEC que contribuyen a la reconstrucción del tejido dañado tales como colágenos tipo I, III, IV y V. Además, expresan una variante de splicing de la fibronectina (ED-A –FN) y la glicoproteína tenascina- C. (Hinz, 2007). Por otro lado, se ha descrito que la secreción de la proteína Periostina juega un papel crítico en la reparación de tejidos y fibrillogénesis del ligamento periodontal (Rios et al, 2008).

Características de fenotipo miofibroblástico

El marcador más aceptado que caracteriza el fenotipo miofibroblasto es la expresión de la isoforma de actina, actina de músculo liso alfa (α -SMA). Se ha identificado que la expresión de esta proteína facilita que los miofibroblastos generen la tensión tisular requerida para la remodelación del tejido en reparación y además, promueve la síntesis de componentes moleculares de la matriz extracelular (MEC). Otro de los marcadores moleculares que caracterizan el fenotipo miofibroblástico es la expresión de la variante por splicing de la molécula de fibronectina, FN-EDA, que se expresa en eventos tempranos de la reparación de tejidos, el fragmento ED-A es incluido en el mRNA de la fibronectina, lo que permite la síntesis *de novo* de FN-EDA de los fibroblastos en el tejido de granulación, la presencia de esta proteína contribuye a la diferenciación a miofibroblasto (Tomasek et al, 2002). La transición entre fibroblasto a miofibroblasto resulta en una remodelación de la MEC, permitiendo un cambio en la tensión mecánica de la matriz (Goldberg et al ,2007). Los miofibroblastos desarrollan adhesiones focales (FA) especializadas que han sido llamadas como “FA supermaduras” que pueden ser identificadas por su mayor tamaño (8-30 μ m). Exhiben una composición molecular específica por la co-expresión de altos niveles de Vinculina, Paxilina, tensina e integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ (Hinz, 2007). Además, estas células sintetizan *de novo* de tensina y la quinasa de adhesión focal (FAK) como parte del fenotipo contráctil (Tomasek et al, 2002).

Matriz extracelular de la herida en reparación.

La MEC es una mezcla compleja de moléculas que incluye glicoproteínas, fibronectina, colágenos, lamininas, proteoglicanos y proteínas no pertenecientes a la matriz como factores de crecimiento. El **colágeno** es la proteína de MEC que se encuentra mayoritariamente en tejidos conectivos, cuya función está relacionada con la estructura y soporte de los tejidos. (Kavitha & Thampan, 2008). Durante la reparación de tejidos se

produce una activa inducción en la síntesis de colágeno que marca el inicio de la maduración del tejido de granulación. Inicialmente las especies moleculares que se sintetizan corresponden a colágeno tipo III y secundariamente a colágeno tipo I (Häkkinen et al, 2000). Sin embargo, a medida que avanza el proceso de remodelación de la herida, el tipo de colágeno mayoritariamente expresado es el tipo I (Häkkinen et al, 2000).

Periostina es una proteína secretada de MEC que se expresa predominantemente en tejidos conectivos fibrosos, que están sujetos a estrés mecánico y que incluyen válvulas cardiacas, tendones y ligamento periodontal. (Norris, et al, 2007). Esta proteína es activamente expresada por células mesenquimales en el tejido miocárdico en remodelación (Bowers et al, 2010). Por otro lado, se ha observado que periostina puede controlar los procesos de fibrillogénesis y organización del colágeno a nivel extracelular (Norris, et al 2007). Periostina forma parte del ligamento periodontal y periostio de ratones adultos y su producción es estimulada por TGF- β 1 en cultivos primarios de osteoblastos (Horiuchi et al, 1999). Particularmente interesantes son los resultados publicados por Rios et al (2005), que muestran que ratones deficientes en periostina desarrollan una forma de enfermedad periodontal agresiva. Esto muestra que, al menos en este modelo animal, periostina jugaría un papel clave en la mantención de la integridad estructural del periodonto y probablemente en la respuesta al daño tisular. Recientemente, se observó que la sobreexpresión de Periostina produce un aumento en la invasión celular a través de geles de colágeno 3D y un incremento en la compactación de la MEC en células de HH25 AV (Butcher et al, 2007). Estos hallazgos ponen en relieve el importante papel jugado por periostina en la regulación de la MEC. Se ha descrito, utilizando expresión global de genes con microarreglos de DNA, que durante la reparación de piel humana uno de los genes que sufre una importante inducción es el de Periostina, lo que sugiere que esta proteína podría jugar un papel significativo en la respuesta al daño tisular (Hamilton, 2008). A la fecha no existen estudios que hayan analizado la expresión de Periostina en la reparación gingival ni tampoco se conocen con mayor detalle los factores que podrían regular su expresión en células de este tejido.

Citoesqueleto y remodelación de la herida en reparación

GTPasa de la familia Rho

Uno de los reguladores clave de la remodelación del citoesqueleto de actina está constituido por las GTPasas de la familia Rho (Ridley, 2001). Estas proteínas son parte de la superfamilia Ras, la que está formada por más de 100 pequeñas proteínas monoméricas (20-30KDa) que se unen nucleótidos de guanina. Generalmente ciclan entre una conformación activa (unida a GTP) y una inactiva (unida a GDP). Cuando están unidas a GTP son capaces de interactuar con sus efectores moleculares e inducir una respuesta celular, como se muestra en la figura 2 (Jaffe & Hall, 2005).

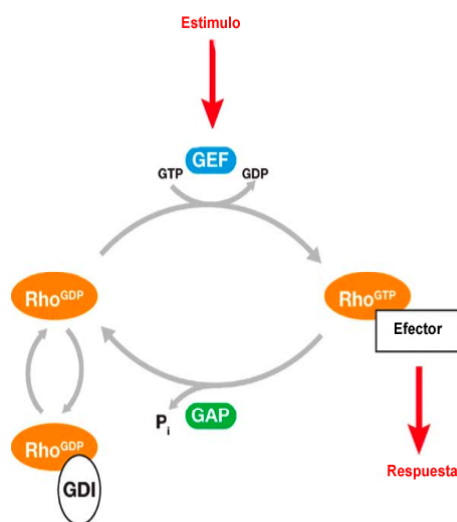


Figura 2: Mecanismo de activación de Rho

El ciclo entre la conformación activa e inactiva está regulada por factores de intercambio GDP/GTP GEF (factor intercambiador del nucleótido guanina) y proteínas que estimulan la actividad intrínseca GAP, permitiendo la conversión al estado inactivo. Moléculas del tipo GDI estabilizan la forma inactiva de la GTPasa al inhibir la disociación GDP.

Los miembros más relevantes de las GTPasas pequeñas de familia Rho son:

Rac, cuya activación está asociada a la formación de lamelipodios, polimerización de actina y la adhesión célula-célula mediada por cadherina.

Cdc 42, que participa en la formación de filopodios, la adhesión célula-célula, desaparición de fibras de estrés (usando como efector a PAK).

Rho, implicada en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, morfología celular, motilidad celular, contracción de músculo esquelético y citoquinesis (Ridley, 2001).

Rho, fibras de estrés y adhesiones focales

Las adhesiones focales son estructuras dinámicas que se ensamblan, dispersan y reciclan permitiendo que la célula se adhiera, cambie de forma y eventualmente migre. Se ordenan como un complejo de proteínas asociado a la membrana celular en torno a receptores específicos de adhesión, como las integrinas y a un conjunto de proteínas cuya función se define en el establecimiento de una interacción entre el microambiente extracelular y el citoesqueleto de actina. Las integrinas en contacto con la MEC se agrupan formando un complejo supramolecular con proteínas asociadas a citoesqueleto (Talina, Vinculina, α -actinina) y numerosas moléculas de señalización (c-Src, FAK, P130 Cas y Paxilina) (Sastry & Burridge, 2000). Asociado a esto, los trabajos de Ridley y Hall concluyen que las fibras de estrés formadas como resultado de la polimerización de actina están ancladas a las adhesiones focales (Jaffe & Hall 2005).

El incremento de la rigidez de la MEC es un fuerte estímulo para la activación de las integrinas lo que se asocia con la formación de adhesiones focales. Como consecuencia de esto ocurre la activación de la vía Rho/ROCK y un incremento en la contractilidad, migración e invasión celular (Larsen et al, 2006). Utilizando el modelo de fibroblastos gingivales, nuestro grupo ha identificado que la actividad de la GTPasa RhoA, estimulada por TGF- β 1, es fundamental en la generación de fibras de F-actina necesarias para la diferenciación miofibroblástica (Smith et al., 2006).

Modelo de geles de colágeno para el estudio de la contracción del tejido de granulación.

Los geles de colágeno 3D constituyen un buen modelo para evaluar *in vitro*, la interacción mecánica entre las células y la MEC y la forma como éstas pueden influir sobre la formación y función de los miofibroblastos. Este modelo simula, al menos en parte, los fenómenos de remodelación de MEC durante la reparación de heridas (Tomasek et al., 2002). En este ensayo, el diámetro de los geles es reducido con el tiempo (horas a días) por la pequeñas fuerzas de tracción que son generadas por los

fibroblastos durante el estiramiento celular y la migración sobre las fibras de colágeno (Tomasek et al, 2002).

Se ha mostrado que la capacidad de contracción de los miofibroblastos es superior a la de fibroblastos que no expresan α -SMA (Arora & McCulloch, 1994). Es así como el grupo de Boris Hinz y colaboradores (2001), evidenció que fibroblastos 3T3 transfectados con el cDNA de α -SMA, manifiestan una mayor capacidad contráctil. Por otro lado, se ha reportado que parte del potencial de contracción de geles de colágeno por parte de los fibroblastos depende de la integrina α 2 β 1 (Gaggioli et al, 2007).

MMPs y remodelación de tejidos

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) corresponden a una familia de 28 endopeptidasas que inicialmente han sido asociadas con las propiedades invasivas de las células tumorales por su habilidad para degradar la mayoría de los componentes proteicos de la MEC (Folgueras et al, 2004). Durante la reparación, las MMPs están involucradas en la degradación de la MEC, facilitando la migración celular requerida para la reepitelización y angiogenesis. Por otro lado, favorecen el depósito de la MEC, el remodelamiento del tejido fibrótico (Le et al, 2007) y activación de factores/citoquinas. (McKeown, 2007).

Una adecuada regulación de la actividad de MMPs es esencial para prevenir una excesiva degradación de la matriz. Este papel es ejercido por un grupo de proteínas endógenas llamadas inhibidores titulares de metaloproteinasas (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4). Los TIMPs se unen al sitio activo de las MMPs, bloqueando el acceso a su sustrato (Santos-Martínez et al, 2007).

Estudios recientes han determinado que la MT1-MMP es la principal proteasa que confiere el fenotipo invasivo dada su capacidad para activar otras MMPs y crear un microambiente promotor de la proliferación (Larsen et al, 2006). MT1-MMP es expresada en células mesenquimales del tejido de granulación en reparación y por esto representa un regulador clave de la remodelación de heridas (Madlener et al, 1998).

Factores de crecimiento derivados de plaquetas

Las plaquetas contribuyen a la hemostasia previniendo la pérdida de sangre en sitios de daño vascular. Esta importante función deriva de la amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas producidas por las plaquetas y que juegan un rol en las primeras etapas de la reparación (Schaffer & Nanney, 1996; Werner & Grose, 2002). Este hecho ha dado pie a la idea de utilizar plaquetas y/o sus derivados como herramienta terapéutica para mejorar la respuesta reparativa en pacientes o condiciones en que la reparación tisular está impedida o significativamente retardada (Anitua et al, 2006). Considerando que el proceso de reparación depende críticamente de la actividad de factores de crecimiento que pueden modular respuestas celulares como proliferación, migración, adhesión y diferenciación miofibroblástica (Werner & Grose, 2002), se ha propuesto recientemente la utilización de preparados enriquecidos en factores de crecimiento obtenidos en forma autóloga a partir de las plaquetas del mismo paciente. Este preparado, conocido como **Plasma Rico en Plaquetas (PRP)**, es aplicado a las heridas con el propósito de favorecer o acelerar en fenómeno de reparación (Anitua et al, 2006).

La preparación del Plasma rico en plaquetas requiere de una centrifugación inicial de sangre venosa, la cual permite la obtención de 3 capas: glóbulos rojos (fracción inferior), PRP (fracción intermedia) y una fracción superior sin células conocida como **Plasma pobre en plaquetas (PPP)**. Esta fracción es normalmente descartada debido a su baja concentración de factores de crecimiento (Dohan et al, 2009).

Considerando que el PRP concentra niveles elevados de factores de crecimiento, la mayoría de los estudios se han enfocado en la respuesta biológica/clínica inducida por esta fracción plaquetaria. El uso tópico de estos concentrados de plaquetas es reciente y su eficacia es aún un tema controversial (Anitua et al, 2006). Los primeros estudios *in vitro* muestran una tendencia general que apunta a que PRP estimula la proliferación de diferentes tipos celulares, incluyendo osteoblastos, fibroblastos, células de tendón y de ligamento periodontal (Cenni et al 2005, Celotti et al 2006, Kawase et al, 2005). Sin embargo, se han publicado resultados contradictorios que apuntan que el efecto de PRP es altamente dependiente del tipo celular estimulado y de la concentración de factores presentes en el preparado (Dohan et al 2009, Cenni et al 2005, Graziani et al, 2006).

La compleja proporción en que se encuentran las moléculas activas en el PRP hace muy difícil el poder separar el papel de un sólo factor de crecimiento o la posible interacción entre ellos. Dentro de las moléculas que podemos encontrar en el PRP se describen (Rozman & Bolta, 2007):

- Moléculas de adhesión: laminina 8, fibronectina, vitronectina.
- Factores de coagulación y proteínas asociadas: Factor V/Va, antitrombina, TFPI.
- Proteasas y antiproteasas TIMP-4, inhibidor de plaquetas FIX, α 1-antitripsina
- Factores fibrinolíticos y proteínas asociadas: plasminógeno, PAI-1, u-PA, osteonectina.
- Factores de crecimiento como, EGF, PDGF, VEGF (A y C), KGF, bFGF, IGF-1, IL-8 y TGF β

Los ligandos de la familia de TGF β (TGF β 1, inhibina, activina y Nodal) activan la señalización luego de favorecer la dimerización y fosforilación de los receptores de TGF-beta (TBRI y II) (Massague, 1987). El receptor tipo II fosforila al dominio quinasa del receptor I, el cual propaga la señal a través de la fosforilación de las proteínas Smad. Las Smad se pueden clasificar en 3 clases funcionales: R-Smad (Receptor-regulated) que incluyen las Smad 1, 2, 3, 5 y 8, que son directamente activadas por la quinasa del receptor tipo I. La Co-Smad, que corresponde a Smad 4 y las tipo I-Smad que corresponden a las Smad 6,7, que regulan negativamente la señalización inducida por TGF β 1 (Shi & Massague, 2003). Los ligandos de TGF β utilizan las Smad 2,3 como moléculas propagadoras de su señalización.

TGF- β 1 forma parte de una amplia familia de factores de crecimiento que juegan un papel clave, tanto en la evolución normal de la reparación de heridas, como en los procesos de fibrosis que ocurren como consecuencia de alteraciones de este fenómeno (Shi & Massague, 2003). Se ha demostrado que TGF- β 1 es capaz de inducir la expresión de α -SMA en fibroblastos *in vitro* e *in vivo* y de estimular la síntesis de MEC, especialmente de colágeno tipo I.

Este factor cumple además importantes funciones en la reparación de tejidos a través de la regulación de la proliferación celular, quimiotaxis y estímulo a la diferenciación de miofibroblastos (Hinz 2007, Tomasek et al, 2002).

Modelo experimental

La encía o tejido gingival está conformada por un epitelio de revestimiento y un corion de tejido conectivo en el que los fibroblastos corresponden a la población celular predominante. Estas células están activamente involucradas tanto en los fenómenos de síntesis como de degradación de MEC en salud y enfermedad (Bartold y col., 2000). Este tejido se encuentra expuesto a diversos estímulos de carácter químico, mecánico y térmico relacionados fundamentalmente con la exposición a los alimentos y el proceso de masticación. Esta continua exposición a agentes injuriantes desencadena una respuesta adaptativa que debe coordinar la eliminación de células dañadas, proliferación celular, neovascularización y un activo proceso de remodelación tisular (Hakkinen et al., 2000).

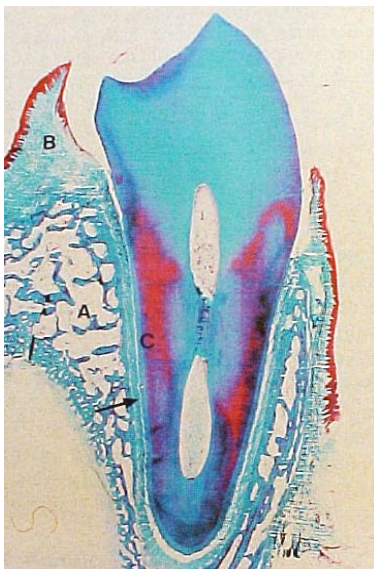


Figura 3 Tejidos Periodontales

Los tejidos periodontales están constituidos por la encía (B) y los tejidos de inserción como cemento (C), ligamento periodontal (→) y hueso alveolar (A).

Los fibroblastos corresponden a una población celular heterogénea y ampliamente representada en los tejidos periodontales. Estas células están activamente involucradas tanto en los fenómenos de síntesis como de degradación de MEC en salud y enfermedad (Bartold et al, 2000). Para lograr estas funciones, los fibroblastos son capaces de remodelar la MEC gracias a la secreción de un amplio repertorio de enzimas proteolíticas, glicoproteínas y proteoglicanos (Bartold et al., 2000).

La infección bacteriana de la encía se traduce en una respuesta inflamatoria conocida como **gingivitis** que busca eliminar el agente agresor y reestablecer la normalidad del tejido (Bartold y col., 2006). Esta lesión puede derivar en un proceso más complejo conocido como **enfermedad periodontal (EP)** o **periodontitis marginal**. Las necesidades de tratamiento por esta enfermedad en la población chilena son extremadamente altas, alcanzando niveles de 99 y 98% en los niveles socioeconómicos bajo y medio y 56% en el nivel alto (Gamonal et al, 1998). La EP se caracteriza por la pérdida de las estructuras de soporte dentario, vale decir, reabsorción del hueso alveolar, destrucción de fibras colágenas del ligamento periodontal y alteraciones patológicas del cemento radicular lo que puede derivar en la pérdida de piezas dentarias (Page & Schroeder, 1976). En busca de terapias que puedan solucionar la pérdida de las estructuras del soporte dentario es que se están generando productos derivados de la sangre para poder favorecer la regeneración tisular.

Tomando estos antecedentes en consideración, hemos planteado para este trabajo, la siguiente hipótesis:

Hipótesis:

El Plasma rico en plaquetas constituye una fracción autóloga de factores de crecimiento que favorece la diferenciación miofibroblástica y la remodelación tisular en fibroblastos gingivales, fenómeno definido por la expresión de proteínas marcadoras de diferenciación y proteínas responsables del proceso reparativo. Este fenómeno es atribuible, al menos en parte, al Factor de Crecimiento Transformante (TGF- β 1) presente en la fracción.

Objetivo 1

Evaluar la capacidad del PRP y PPP para estimular la capacidad contráctil, dependiente del citoesqueleto de actina, de fibroblastos gingivales en geles tridimensionales de colágeno.

Evaluaremos la capacidad de PRP y PPP para estimular la contracción de geles de colágeno y asociaremos esta propiedad con el potencial proteolítico celular dependiente de MMPs y la funcionalidad del citoesqueleto de actina. Para esto utilizaremos inhibidores genéricos de MMPs (Ilomastat), inhibidores de serín-proteasas (aprotinina) y de la polimerización del citoesqueleto de actina como citocalasina D y el inhibidor de la quinasa ROCK dependiente la actividad de RhoA (Y-27635).

Adicionalmente, en fibroblastos gingivales estudiaremos el efecto de PRP y PPP sobre la actividad de la GTPasa RhoA, responsable del reordenamiento del citoesqueleto de actina. Evaluaremos el posible estímulo de PRP y PPP sobre la actividad de la GTPasa RhoA, mediante un ensayo de pull down.

Objetivo 2

Caracterizar el efecto del Plasma rico en plaquetas (PRP) y PPP sobre la diferenciación miofibroblástica.

En cultivos primarios de Fibroblastos gingivales (FG) estudiaremos la diferenciación hacia el fenotipo miofibroblástico estimulado por el PRP y PPP.

Para esto utilizaremos cultivos de células obtenidas de tejido gingival estimulados con diferentes concentraciones de PRP y PPP, para luego analizar su efecto sobre la producción de marcadores de diferenciación α -SMA, colágeno I y su molécula chaperona HSP47, FN-EDA y proteínas a las que se les atribuye un papel importante en reparación, como MT1-MMP, periostina y osteopontina.

Objetivo 3

Evaluar si la concentración de TGF- β 1 presente en el PRP y PPP de diferentes pacientes se relaciona con la diferenciación de miofibroblastos gingivales.

Dado que la magnitud de la respuesta clínica al PRP y PPP ha mostrado ser altamente variable, nos interesa relacionar el efecto estimulador de PRP y PPP obtenidos de diferentes individuos sanos, sobre la producción de moléculas marcadoras de diferenciación miofibrobástica y proteínas asociadas al fenómeno reparativo con los niveles de TGF-beta expresados en ambas fracciones de plasma. Para ello, correlacionaremos la expresión de estas proteínas con la cuantificación de TGF- β 1 en el PRP y PPP evaluados mediante un ensayo ELISA. Se utilizará como control positivo el estímulo de TGF- β 1 recombinante sobre la inducción de α -SMA y la activación de la vía Smad.

Utilizando un inhibidor de la actividad quinásica de T β R-I (ALK-5) esperamos interferir en la diferenciación miofibroblástica estimulada por PRP y/o PPP en fibroblastos gingivales. Esto nos permitirá asociar la dependencia del fenómeno de diferenciación con la presencia de TGF- β 1 en los concentrados de factores plaquetarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos y equipos

Los instrumentos y equipos utilizados para realizar todos los procedimientos necesarios para dar respuesta a la hipótesis planteada son: campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129, incubador Lab-line CO₂ automático, cámaras de corrida y transferencia BioRad, centrifuga Biofuge prime R Heraeus, microscopio invertido de contraste de fase Nikon modelo TMS-F y lector de ELISA modelo Elx-806.

Materiales

Los reactivos usados en esta tesis se obtuvieron de los siguientes proveedores:

Abcam (Cambridge, MA): anticuerpo para HSP-47, FN-EDA, TIMP-2 y Periostina.

BioRad laboratorios Inc, Melville NY, USA: 30% Bis acrilamida, membranas PVDF.

Chemicon (Temecula, CA): inhibidor de metaloproteinasas Ilomastat (GM6001).

Calbiochem (San Diego, CA): inhibidor de ROCK (Y-27632)

Cytoskeleton, Denver CO, USA: anticuerpo para RhoA

Gibco BRL, (Maryland USA) : Tripsina-EDTA, α MEM, DMEM y Normocina.

Merck Whitehouse Station, NJ : p-formaldehido, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, Dodecil sulfato de sodio (SDS), Cloruro de Potasio, Fosfato dibasico de Potasio, Cloruro de Magnesio, Cloruro de Sodio.

Sant Cruz Biotechnology ,Santa Cruz, CA: anticuerpo para p- Smad 2,3, Smad 2,3 y Colágeno tipo I.

Sigma St Louis, MO, USA: DMSO, tripsina, IPTG, glutation Sefarosa.

Anticuerpo para α -SMA, Actina , Vinculina y Tubulina. Inhibidores de proteasas: ortovandato, leupeptina, aprotinina, PMSF, pepstatina. Inhibidor de la polimerización de actina (Citocalasina D)

R&D Systems, Minneapolis, MN, USA: anticuerpo para MMP14 y Folistatina humana recombinante.

Rockland Gilbertsville, PA: Albumina de suero Bovino (BSA). Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa anti Mouse, anti rabbit y anti goat

TCL, Chile metanol, papel filtro para transferencia, placas de cultivos Orange Scientific.

Tocris bioscience, Missouri USA: Inhibidor de TBRI (SB 431542)

US biological Tris, glicina, SDS, Cloruro de Sodio, Cloruro de Magnesio, glicerol, Tritón X-100, Tween 20.

Métodos

1. Almacenamiento y Cultivo de fibroblastos de encía

Cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron mediante el método de explante (Larjava , et al, 1989). Los explantes de tejido se obtuvieron partir de tejido retromolar de 5 pacientes durante la extracción de terceros molares en una clínica odontológica privada de Santiago. La muestra de tejido se cultivó con el consentimiento informado del paciente y el protocolo para la obtención de tejidos fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las células fueron cultivadas en medio modificado alfa eagle (α MEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, EE.UU.), en presencia de suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco BRL), 100 μ g/ml de penicilina (Sigma), 100 μ g/ml estreptomycin (Sigma) y 50 μ g/ml de gentamicina a 37 °C en el 5% de CO₂ de atmósfera. Todos los experimentos se realizaron con células entre el tercer y décimo pasaje.

Para el almacenamiento de las células, éstas se congelaron mediante descenso gradual de la temperatura, en una mezcla SFB al 90% y DMSO al 10% y almacenados en N₂ líquido.

2. Plasma rico en plaquetas (PRP) y Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)

Los plasmas se obtuvieron a partir de varones cuyas edades fluctuaron entre los 20-30 años con el consentimiento informado de cada donante, utilizando un sistema de origen comercial (GPSII, de Biomet Biologics). Se extrajeron 55 mL de sangre venosa en una jeringa que contenía 5 mL de citrato de sodio. La sangre se introdujo en el kit de separación para su centrifugación por 15 minutos a 3200 rpm. Esta centrifugación nos permitió obtener 3 fracciones. En la parte superior del tubo el plasma pobre en plaquetas (PPP), en la fase inferior los eritrocitos y el plasma rico en plaquetas (PRP) en la fase intermedia entre los eritrocitos y el PPP.

En paralelo se realizó la mezcla para la agregación plaquetaria, que consistió en la extracción de 10 ml de sangre, sin anticoagulante , la cual se centrifugó durante 5 minutos a 3200 rpm (Biomet Biologics Centrifuge 120 Volt 50 – 60 Hz). Se obtuvo alrededor de 3 mL de sobrenadante por cada paciente (trombina autóloga), a la cual se le agregó 300 μ L CaCl₂ 10% para producir una mezcla activadora de plaquetas. Iguales volúmenes de esta mezcla se agregaron a ambos plasmas, los cuales se incubaron durante 1 hora a 37°C para permitir la formación de los coágulos. Posteriormente la muestra fue centrifugada durante 7 minutos a 1800 rpm, y los sobrenadantes fueron

utilizados en nuestros experimentos como factores de crecimientos solubles a partir de PPP y PRP. Las alícuotas de ambas fracciones plaquetarias fueron almacenadas a -80°C.

3. Western-blot

Esta técnica se utilizó para estimar los niveles de proteínas en los lisados de células estimuladas con las diferentes condiciones experimentales.

Las células se lavaron con PBS frío y luego se lisaron en solución de lisis que contiene 50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 1% Tritón X-100, 10% glicerol, 2 mM PMSF, 2 µg/ml pepstatina, 2 µg/ml leupeptina and 1 mM ortovanadato a 4°C. Los lisados se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm. Se rescató el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas mediante el sistema de origen comercial DC protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Los distintos lisados se mezclaron con tampón de carga 4X y β-mercaptoetanol (concentración final 5%). Iguales cantidades de proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador preteñido de proteínas (SM0671 Fermentas). Luego de la corrida electroforética (80-100V) se transfirieron las proteínas a una membrana difluoro-polivinilideno (PVDF Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA), previamente activada con metanol. Transcurrida la transferencia, las membranas se incubaron durante una hora con solución de bloqueo (leche descremada al 5% en TBS-tween 0,01%), luego se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios α-SMA (1:1000), p-Smad 2,3 (1:1000), Smad (1:1000), Actina (1:5000), Tubulina (1:5000), HSP-47 (1:2000) , MMP14 (1:1000), TIMP-2 (1:1000), Colágeno tipo I (1:500), FN-EDA (1:1500) y Periostina (1:1000). Posteriormente, las membranas se lavaron con solución de lavado (Tween al 0,1% en TBS) y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Se repitió el lavado de las membranas y se detectaron los complejos anticuerpo-antígeno utilizando un sistema comercial de quimioluminiscencia (PIERCE Termo Scientifics) y la detección se realizó con películas fotográficas (Kodak)

Las películas fueron digitalizadas y el análisis densitométrico de la bandas se realizó mediante el programa Kodak Molecular Imaging software versión 4.0 (MI4.0).

Para remover los anticuerpos unidos de las membranas (stripping), estas fueron tratadas con una solución de bloqueo y azida de sodio al 0,1% a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las membranas se lavaron con TBS Tween al 0,1% durante 1h y se incubaron nuevamente con anticuerpos dirigidos contra las formas totales de las proteínas o β Actina o Tubulina, utilizándolos como control de carga de las proteínas en el gel.

4. Pull down

La actividad de las GTPasas se realiza mediante el ensayo de pull down. Para esto, la fracción activa (unida a GTP) se separa de la masa total de la GTPasa mediante la unión a una proteína de fusión que expresa los dominios de unión de la proteína efectora a su GTPasa. El constructo que codifica para el dominio de unión a Rho de la proteína efectora Rotequina como proteína de fusión (GST-RBD) fue amablemente cedido por Keith Burrige en bacterias dH5alpha. 5×10^6 células se lavaron con PBS frío y fueron lisadas con amortiguador 50mM Tris pH 7,6, 0,5mM $MgCl_2$, 500 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 0,5% deoxicolato, 10ug/mL de aprotinina y leupeptina, 1 mM PMSF. Los lisados se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante fue incubado durante 30 minutos en agitación con 20 μ g de proteína de fusión (GST-RBD). Los inmunocomplejos fueron lavados 3 veces con amortiguador de lisis, hervidos y cargados para realizar el proceso de inmunoblot.

5. ELISA para TGF β 1

Los niveles de TGF β 1 fueron cuantificados mediante un sistema ELISA de origen comercial (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra de cada paciente se cuantificó en cuadruplicado. Las muestras de plasmas se diluyeron 1/5 en PBS, se acidificaron con HCl 1N (1:25) durante 60 minutos a 4°C y luego se neutralizaron con NaOH. Estas muestras fueron cuantificadas de inmediato o luego de guardarlas a -80°C para posterior análisis. La curva estándar de TGF β 1 se realizó mediante diluciones seriadas a partir de un stock de 150 ng/mL. Se agregaron 100 μ L de anticuerpo anti TGF β 1 (1:250) diluido en buffer de captura (0,1 M carbonato de sodio pH

9,5 (0,083 M NaHCO₃ , 9,52mM Na₂CO₃) a placas Polisorp de Nunc durante 16 h a 4°C. Posteriormente se eliminó el anticuerpo volteando enérgicamente la placa y se realizaron 3 lavados con solución de lavado (PBS 0,05% Tween-20). El bloqueo se realizó durante 1 h a temperatura ambiente con PBS 10% SFB. Se eliminó la solución de bloqueo y se lavó 3 veces con solución de lavado. Posteriormente se agregaron las muestras a cuantificar durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. En paralelo, se preparó la incubación del anticuerpo (detection antibody biotin anti humano) 1:250 en PBS en presencia de SFB al 10% con concentrado de enzima streptavidina-HRP (1:250 en PBS SFB al 10%). Se realizaron 7 lavados para su posterior incubación con los sustratos (tetrametilbenzidine TMB y peroxido de hidrogeno) durante 30 minutos. Una vez desarrollado el color, se detuvo la reacción con 1M H₃PO₄ y se cuantificó a 450 nm con una corrección a 570 nm.

6. Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio. Después de los tratamientos con PRP y PPP durante 24 h, los cubreobjetos fueron lavados una vez con amortiguador fosfato salino (PBS), fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min y permeabilizadas con Tritón X-100 0,025% durante 2 minutos. Posteriormente se bloquearon durante 1 h con BSA 4% diluido en PBS a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos primarios diluidos en PBS/BSA al 1% para FN-EDA (1:200) y HSP-47 (1:200) Vinculina (1/100) durante 1 h. Luego, se lavaron los complejos antígeno-anticuerpo con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios anti ratón conjugados a FITC (Molecular Probes). La marcación para F-actina fue mediante Alexa Fluor 594 faloidina Rhodamina (Molecular Probes). En caso de observar marcaje nuclear se utilizó Prolong Gold antifade reagent con 4,6-Diamidino-2 fenil-Indol DAPI (Invitrogen) o reactivo de montaje Vectashield (Vector Laboratorios Inc, Burlingame CA).

7. Cultivo tridimensional de células ó Geles de contracción de colágeno.

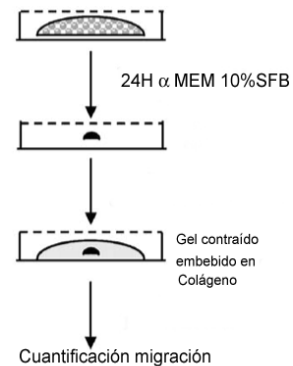
Se utilizó el modelo de contracción en geles de colágeno como forma de simular la contracción del tejido de granulación durante la reparación de heridas (Grinnel, 2006). Los hidrogeles de colágeno tipo I se prepararon a partir de colágeno obtenido de cola de rata (Elsdale & Bard, 1976). Brevemente, los tendones fueron solubilizados en ácido

acético 0,1 N durante 3 días con agitación a 4°C. La solución se filtró través de una gasa estéril. Posteriormente se ultracentrifugó a 17.000 g durante 2 h a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó como solución de colágeno tipo I. Esta solución se dializó contra DMEM (a una concentración de 1/10 de la concentración del medio y a pH 4,0), durante 48 horas, cambiando el medio cada 24 h y en agitación constante a 4°C. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Una concentración de 1mg/mL de los monómeros solubles de colágeno (diluidos en DMEM 1X) se mezcló con 1×10^5 cel/ml, creando una distribución homogénea celular a la cual se le agregó una solución de neutralización de DMEM 4X, y se incubó a 37°C durante 1 hora hasta esperar su polimerización. Después de 72 h se evaluó la contracción de la matriz de colágeno midiendo el diámetro del gel, y se expresó como fracción de área del gel mediante la formula πR^2 , en donde el 100% del área correspondía al pozo de 24 (Gottrup et al, 2000).

8. Migración en nido

Para cuantificar la migración en un modelo 3D de colágeno, 1×10^5 fibroblastos fueron inmersos en un gel de colágeno (1 mg/mL) con un volumen final de 150µL en placa de 48 pozos. Después de ser incubados durante 24 horas en α MEM en presencia de SFB al 10%, los geles contraídos fueron inmersos en un segundo gel de colágeno, donde primero se colocó el gel contraído sobre una gota de 50 µL



de colágeno y encima los 150 µl restantes de colágeno previamente neutralizado. Una vez polimerizado el segundo gel, se incubaron los nidos (geles contraídos inmersos en colágeno) durante 24 horas en presencia de PPP, PRP al 25%, TGFβ1 (10 ng/mL) y SFB al 10%. Se cuantificó la migración en todo el contorno del nido y se expresó como en células/campo. (Aumento 10X) (Grinnel, 2006).

9. Migración desde explantes

Los explantes de encía humana fueron obtenidos mediante un sacabocado (Punch dérmico Acuderm Inc.) de tamaño 1,5 mm durante la exodoncia de terceros molares incluidos. Estos explantes fueron cultivados al interior de un film de colágeno tipo I (100 µg/mL). Los explantes se incubaron durante 5 días con 25% de PPP y 25% de PRP. Como control positivo de migración se utilizó SFB al 10%. La migración de los explantes fue fotografiada a los 5 días.

10. Migración en insertos bicamerales tipo Transwell

Con el propósito de evaluar la capacidad invasiva de las células utilizamos el ensayo de invasión en un sistema bicameral tipo Transwell (Costar Corp) de tamaño de poro 8 µm. Brevemente, el filtro poroso de las cámaras fue pre-tratado con 10 µg/mL de una matriz extracelular reconstituida (Matrigel). Las células fueron luego sembradas (50×10^3 fibroblastos gingivales) en medio sin suero. La migración fue estimulada adicionando PRP o PPP al 25 % o SFB al 10% en el compartimiento inferior del Transwell (estímulo quimotáctico). Luego de 16 h de migración, las células que no migraron se removieron de la parte superior del filtro y las células que atravesaron el filtro (migrantes) fueron teñidas con una mezcla de cristal violeta y etanol (0,2% p/v CV y etanol 10% v/v en agua). El número de células fue cuantificado y expresado como células/campo (Cáceres et al, 2005).

11. Extracción de RNA total desde monocapas de fibroblastos gingivales

A cada placa se agregó 1 mL de reactivo Trizol (Invitrogen, life Technologies) y se dejó actuar durante 5 min, para luego homogenizar mediante el paso reiterado del lisado por la punta de una micropipeta. Luego se transfirió el lisado a un tubo eppendorf de 1,5mL. Se adicionó 200µL de cloroformo por mL de Trizol, agitándose suavemente durante 15 segundos, se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente (RT), luego de esto se centrifugaron las mezclas a 10000 rpm durante 5 min, separando la mezcla en una fase acuosa que contiene el RNA total (transparente) y una fase orgánica (roja). Se rescató la fase acuosa (aproximadamente 600 µL) y se adicionó 500 µL de alcohol isopropílico, se agitó en un vortex durante 10 segundos y se incubó durante 10 min a RT. Luego la mezcla fue sometida a centrifugación durante 5 min a 10000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 75%. Luego de una nueva centrifugación se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 20 min a

RT. Se realizó un tratamiento con DNasa RQ1 libre de RNAasas (Promega, Madison, Wi, EEUU) para eliminar el posible DNA genómico. Se dejó actuar por 30 min y luego se detuvo la reacción elevando la temperatura a 70°C por 10 min. Se re-precipitó el RNA utilizando fenol-cloroformo y LiCl 3 M. Finalmente el precipitado se re-disolvió en 25 µL de agua DEPC para luego determinar la concentración y grado de pureza del RNA en un espectrofotómetro UV 260 y 280 nm.

Una vez evaluada la concentración de RNA, el DNA complementario fue sintetizado por 1 hora a 42°C con transcriptasa reversa M-MLV (Promega) utilizando Oligo dT (Gibco). Brevemente: se tomaron 2 µg de RNA y se mezclaron con 1 µL de Oligo dT 50 µM y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para alcanzar un volumen de 15 µL. Esta mezcla se calentó durante 5 minutos a 72°C, para luego dejar en hielo durante 3 min. Posteriormente se agregó 5 µL de tampón de enzima 5X, 1,5 µL de dNTP 10mM, 0,8 µL de transcriptasa inversa 200 U/µL y agua libre de nucleasas hasta completar 25µL de volumen de reacción. Finalmente se realizó la síntesis de cDNA a 42°C durante 1 hora. Una vez obtenido el cDNA de cada muestra, se hizo una dilución 1/100 (en agua libre de nucleasas) y se analizó en un espectrofotómetro la concentración de cDNA obtenida en cada muestra. El cDNA se almacenó a -20°C.

Las secuencias de los partidores utilizados fueron los siguientes:

TIMP-2

F	5'	ATACCAGCGTTATGAAGATC	3'
R	5	GTTTGCAGGGGATGGATAAACA	3'

18S

F	5'	GGACACGGACAGGATTGACA	3'
R	5	GGACATCTAAGGGCATCACAG	3'

α-SMA

F	5'	GCAGCCCAGCCAAGCACTGTCAGGAAT	3'
R	5	AGCCCAGAGCCATTGTCACACACCAAGG	3'

RESULTADOS

Obtención del PRP y PPP de donantes humanos.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 6 individuos voluntarios sanos. Sus características antropométricas se describen en la tabla 1.

Donante	Edad	Peso (kg)	Altura (m)	IMC	mL PPP
1	22	79	1,77	25,2	29
2	22	82,5	1,82	25,18	25
3	23	75	1,76	24,21	26,5
4	26	62	1,68	21,97	27
5	29	87	1,77	27,77	29
6	29	88	1,72	29,75	35
Promedio	25,16	78,91	1,752	25,68	28,58

Tabla 1. Datos antropométricos de los dadores de sangre.

La tabla muestra la edad, peso, estatura, índice de masa corporal (IMC) y volumen de PPP obtenido para cada individuo. El índice de masa corporal se calculó utilizando la siguiente fórmula (peso kg/ estatura m²).

El volumen promedio de PRP fue de 7,0 mL (constante para todos los casos) y de PPP 28,58 mL. En la figura 4 se muestra la imagen del PRP y PPP luego de la centrifugación y activación.

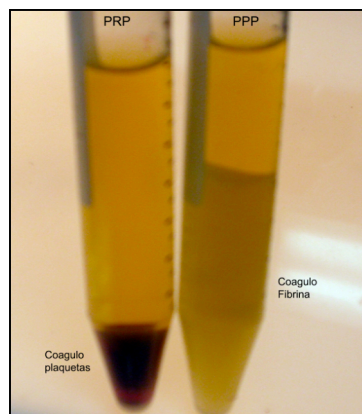


Figura 4 : Imagen de ambas fracciones derivadas de plaquetas (PRP y PPP) después de la centrifugación y activación con Cloruro de Calcio y Trombina autóloga.

I. Efecto del PRP y PPP sobre la contracción de geles de colágeno.

Durante la reparación de heridas la MEC del tejido de granulación es activamente remodelada. Este proceso de remodelación puede ser estimulado por factores de crecimiento y citoquinas presentes en el entorno de la herida en reparación. Para identificar el papel de PRP y/o PPP en la modulación de la contracción y/o remodelación de la MEC, se utilizaron cultivos tridimensionales de fibroblastos inmersos en colágeno. Estos geles fueron estimulados con concentraciones crecientes de PRP y PPP (5- 30%) durante 72 h en ausencia de SFB. Tanto el PRP como el PPP estimularon la contracción de geles de colágeno de una manera dosis dependiente, siendo significativa la diferencia con respecto al control a partir del 20%. Si bien el PRP mostró una mayor actividad en la reducción del diámetro de los geles de colágeno en comparación con el PPP, estas diferencias no alcanzaron significación estadística entre sí.

I.1 Contracción geles de colágeno

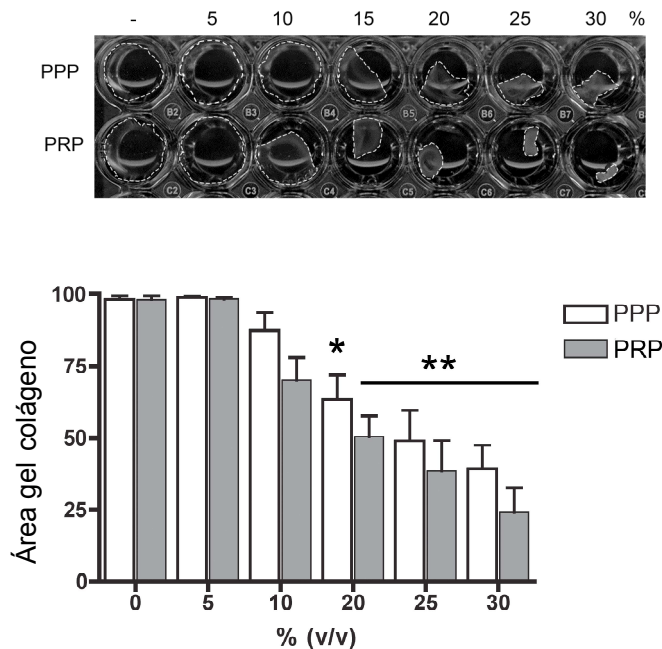


Figura 5. Efectos de PPP y PRP sobre la contracción de geles de colágeno

A. Imagen representativa de la contracción de geles de colágeno después de 72 h de incubación con concentraciones crecientes de PRP y PPP. **B.** El Gráfico muestra el promedio en la variación del área del gel. Los datos fueron obtenidos de 4 experimentos independientes. Barras indican desviación estándar. $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

En el proceso de remodelación de la herida participan células mesenquimales que a través de la contracción del citoesqueleto de actina pueden contraer la MEC y de esta forma reducir el volumen de la herida. Por otra parte, la matriz colágena puede ser remodelada por la actividad proteolítica ejercida por las mismas células mesenquimales involucradas en la reparación del tejido. Para analizar este fenómeno se cultivaron fibroblastos al interior de geles 3D que fueron pretratados con el inhibidor de la polimerización del citoesqueleto de actina Citocalasina D (10 μ M) y el inhibidor genérico de metaloproteinasas Ilomastat (10 μ M). Luego de 72 h se cuantificó la contracción de los geles de colágeno. En la figura 6 se observa que la contracción del gel estimulada por PRP y PPP fue inhibida por citocalasina D e Ilomastat.

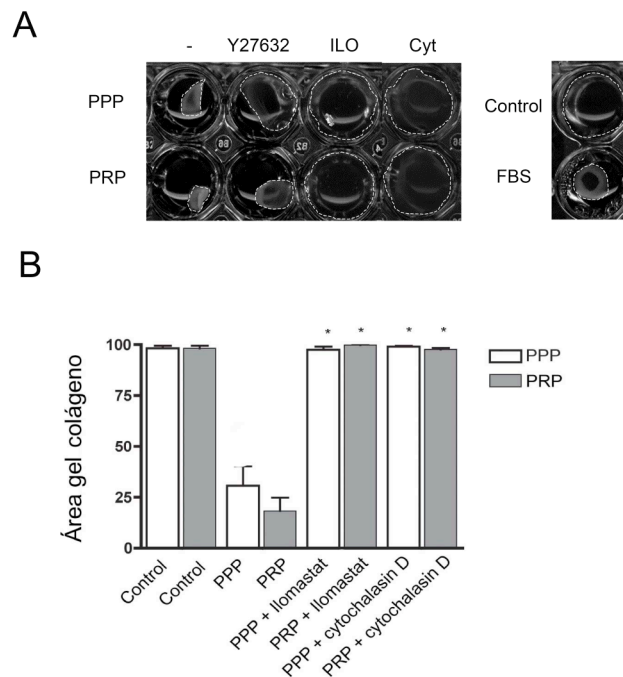


Figura 6 Ilomastat y Citocalasina D inhiben la contracción de geles de colágeno inducida por PRP y PPP.

A Imagen representativa de la contracción de geles de colágeno después de 72 horas de tratamiento con una concentración de 25% de ambos plasmas, previamente tratados con Ilomastat 10 μ M y con Citocalasina D 1 μ M. **B** Gráfico muestra el promedio de variación del área de los geles. Estos datos fueron obtenidos de 4 experimentos independientes. Las barras indican desviación estándar. $*=p<0,05$, indica diferencias significativas del tratamiento con los inhibidores con respecto a PRP y PPP (Test de Dunnett).

I.2 Efecto de PRP y PPP sobre la producción de MT1-MMP y TIMP-2

MT1-MMP es una metaloproteínasa unida a la membrana capaz de mediar la proteólisis pericelular de componentes de la MEC y a la que se le ha asignado un papel importante en la remodelación tisular. Con el propósito de conocer el efecto de PRP y PPP sobre la producción de MT1-MMP, se estimularon fibroblastos gingivales con estas fracciones de plaquetas durante 72 h. En la figura 7 se observa que tanto PRP como PPP aumentaron los niveles de MT1-MMP en el lisado celular. El análisis mediante Western-blot del PRP y PPP no permitió identificar la presencia de MT1-MMP en estas fracciones de plaquetas lo que permite argumentar que la proteasa en estudio provenía de los fibroblastos gingivales.

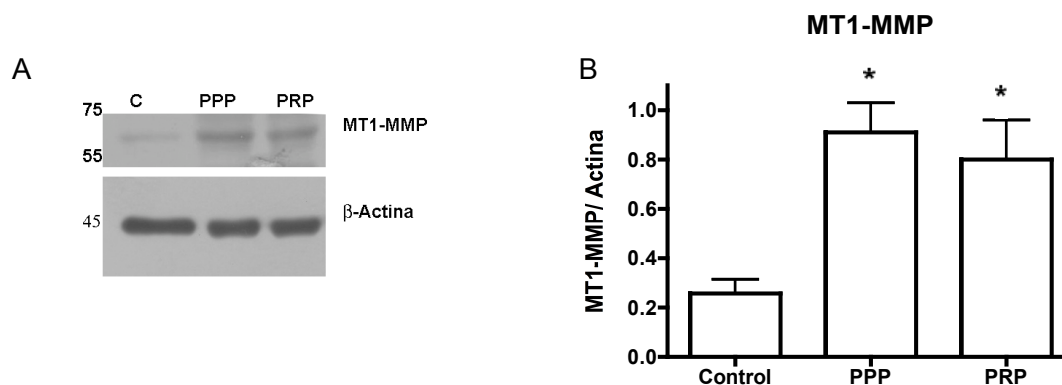


Figura 7 Efectos de PRP y PPP sobre los niveles MT1-MMP.

A La imagen muestra un Western-blot para MT-1 MMP y actina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de PRP y PPP durante 3 días. **B** El gráfico muestra el promedio de los niveles de MT1-MMP, normalizados contra β actina proveniente de 5 experimentos independientes. Barras indican error estándar. $*=p<0.05$, indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

TIMP-2

La actividad proteolítica neta derivada de la acción de MMPs resulta del equilibrio entre las proteasas activas y sus inhibidores que, en el caso de MT1-MMP, corresponde a TIMP-2 (Zucker et al, 1998) . Se evaluó entonces los niveles de TIMP-2 bajo el estímulo de PPP y PRP. Se pudo observar que ambas fracciones estimularon la producción del inhibidor TIMP-2, resultado que sugiere que la remodelación tisular inducida por PPP y PRP estaría siendo controlada por este inhibidor tisular (Figura 8)

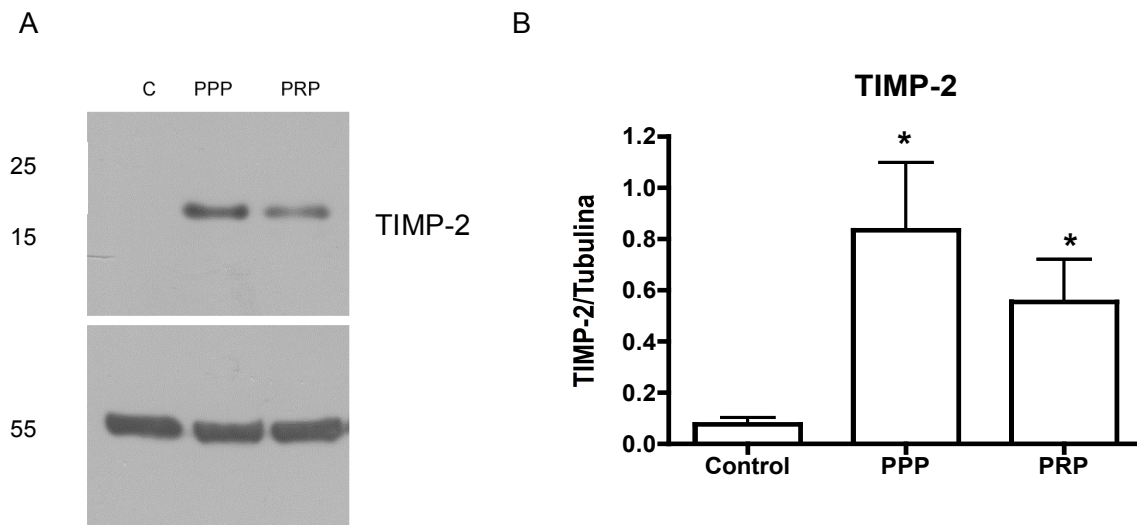


Figura 8. Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de TIMP-2 en fibroblastos gingivales humanos.

A. La imagen muestra un Western-blot para TIMP-2 y Tubulina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de ambas fracciones plaquetarias durante 3 días. **B.** Gráfico muestra el promedio de 5 experimentos independientes con 4 donantes. Barra indica error estándar. $*=p<0.05$, indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

I.3 Efecto del PRP y PPP sobre la activación de la GTPasa RhoA, la polimerización del citoesqueleto de actina y formación de contactos de adhesión focal.

Con el propósito de evaluar el papel de la GTPasa RhoA en la remodelación del citoesqueleto de actina de fibroblastos gingivales sometidos al estímulo de las fracciones de origen plaquetario, analizamos la activación de esta GTPasa por medio de un ensayo de “pulldown” que permite identificar la fracción de la GTPasa unida a GTP (fracción activa). Como se observa en la figura 9, los fibroblastos estimulados con PPP y PRP manifestaron un incremento en la fracción activa de RhoA a los 30 min, lo que permite explicar la contracción de los geles de colágeno estimulada por las fracciones de origen plaquetario (Figura 5).

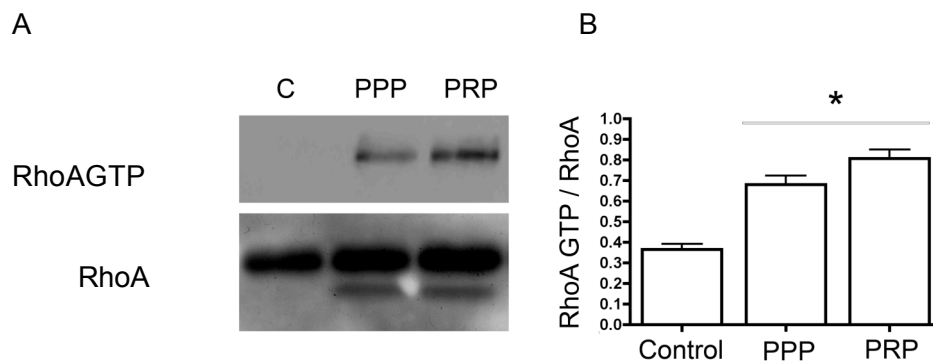


Figura 9 Efecto de PRP y PPP sobre la activación la GTPasa RhoA

A La fracción activa de RhoA (RhoA-GTP) fue identificada mediante un ensayo de pulldown. Para esto, los fibroblastos gingivales fueron estimulados con PRP o PPP (25%) por 30 min. **B**. El gráfico muestra el promedio de 5 experimentos independientes en los cuales se indica la variación en la fracción activa (RhoA-GTP) con respecto RhoA total. Las barras indican el error estándar. $*= p < 0,05$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

Se analizó morfológicamente la distribución del citoesqueleto de actina y de la proteína del contacto de adhesión focal Vinculina en fibroblastos estimulados con PRP y PPP (25%). En la figura 10 se muestra que PPP, y en menor medida PRP, estimularon la formación de fibras de Actina. Para el caso de los contactos focales, se observó que el PPP estimuló moderadamente la marca de Vinculina localizada a este nivel. En el caso del PRP este efecto no fue tan evidente.

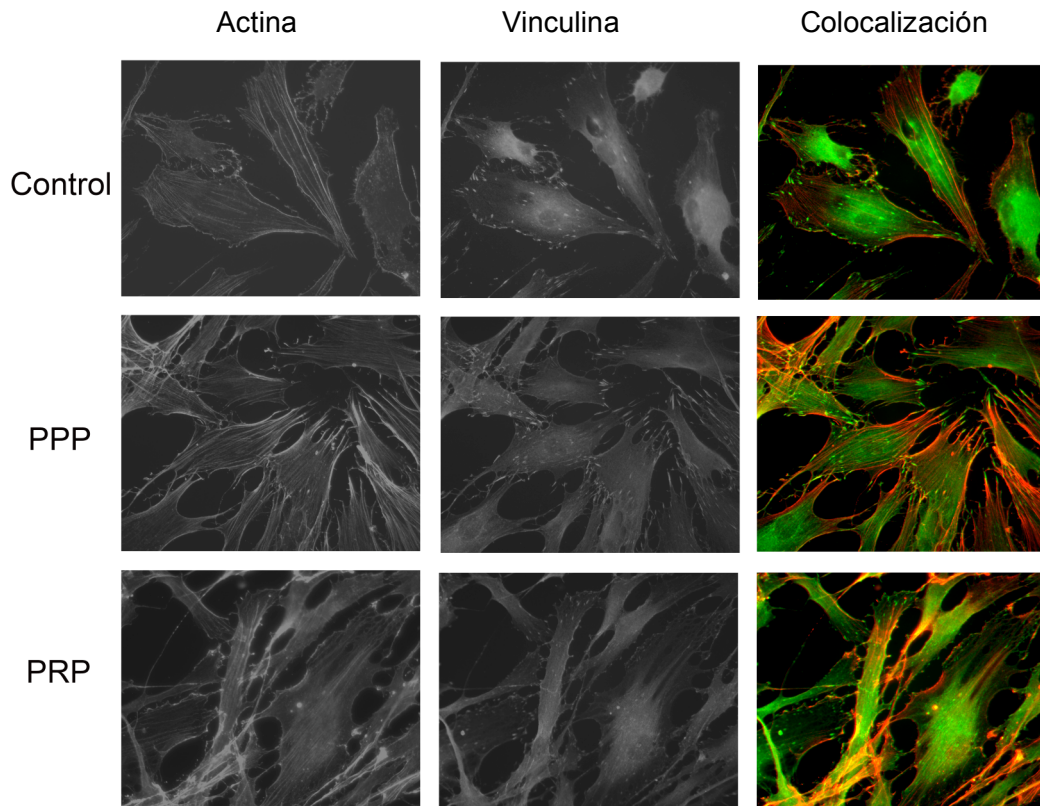


Figura 10. Efectos de PRP y PPP sobre la formación de fibras de Actina y contactos focales.

Fibroblastos gingivales humanos fueron estimulados con 25% de PRP y PPP durante 24 h. Las células fueron fijadas en paraformaldehído y procesadas para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra Vinculina y faloidina-rhodamina Aumento 63X.

Localización de proteínas fosforiladas en tirosina (p-Tyr).

Las adhesiones focales contienen altos niveles de proteínas fosforiladas en tirosina, las cuales ejercen un rol como moléculas de señalización. La formación de adhesiones focales está acompañada de la fosforilación de proteínas como quinasa de adhesión focal (FAK), Paxilina y Tensina (Owen et al, 2005). Se pudo observar que la inmunomarcación para fosfo-tirosina se distribuyó mayoritariamente a nivel citoplasmático en las células control y estimuladas con PRP. Por el contrario, las células estimuladas con PPP mostraron una marcación fundamentalmente en áreas morfológicamente compatibles con los contactos de adhesión focal.

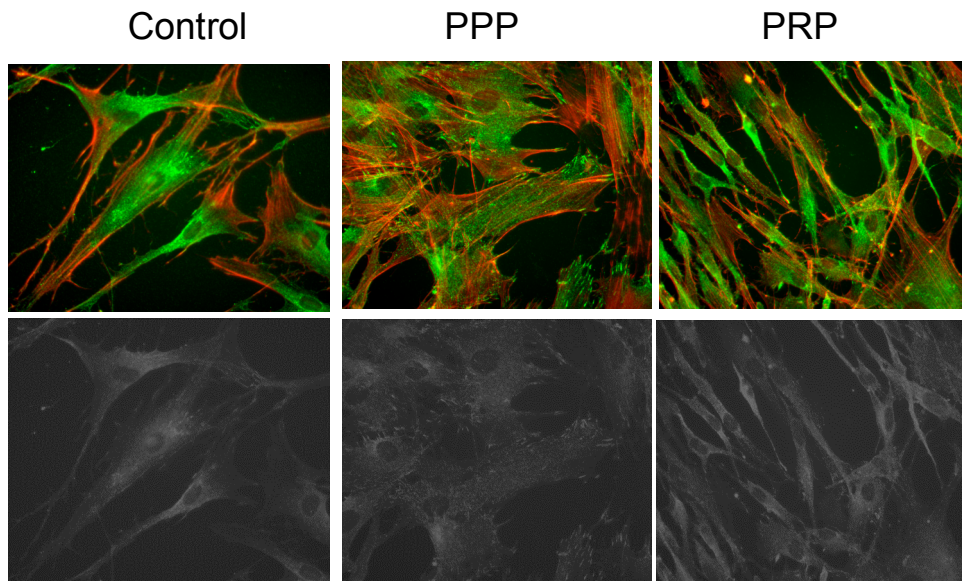


Figura 11 Localización de proteínas fosforiladas en tirosina

Inmunofluorescencia para fosfo tirosina (p-Tyr) en color verde y F-Actina en color rojo en fibroblastos gingivales tratados durante 24 horas con 25% de PRP y PPP. Imagen en blanco y negro corresponde al marcaje específico de P-tyr.

Aumento 63X.

II. Efecto de PRP y PPP sobre la diferenciación del fenotipo miofibroblástico en fibroblastos gingivales humanos.

II.1 α -SMA

El marcador celular más aceptado para identificar al fenotipo miofibroblástico es la expresión de la isoforma de Actina α -SMA. Se ha identificado que los miofibroblastos son capaces de producir la tensión tisular requerida para la remodelación del tejido en reparación y de mediar la síntesis de componentes de la MEC que permiten restituir el tejido dañado.

Primariamente se analizó si es que PPP y PRP podían estimular la diferenciación de fibroblastos gingivales hacia el fenotipo miofibroblástico. Con este fin, los fibroblastos gingivales fueron estimulados por 72 h con PPP y PRP. Como control positivo se utilizó TGF- β recombinante. En la figura 12 se puede observar que tanto PPP como PRP estimularon la producción de α -SMA, siendo el efecto de PPP estadísticamente superior al de PRP ($p < 0.05$).

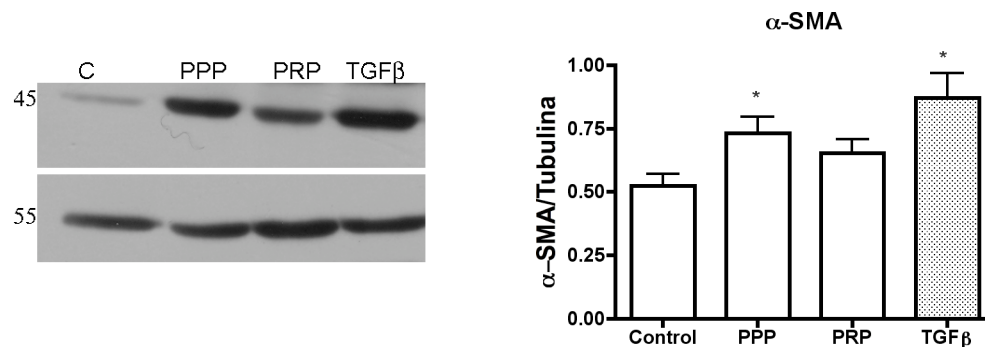


Figura 12 Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de α -SMA.

La imagen muestra un Western-blot para α -SMA y tubulina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de ambas fracciones plaquetarias durante 3 días. El gráfico muestra el promedio de 6 experimentos independientes en los cuales se indican los niveles de α -SMA normalizados con respecto a tubulina. Las barras indican el error estándar. $* = p < 0,05$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

II.2 Fibronectina ED-A

Fibronectina ED-A es una isoforma del gen de fibronectina que se expresa particularmente en tejidos embrionarios y durante la diferenciación miofibroblástica. La inserción del módulo ED-A dentro de la molécula de fibronectina genera un cambio conformacional que incrementa los fenómenos de adhesión. Decidimos analizar la producción de esta isoforma de fibronectina bajo el estímulo de los factores plaquetarios. En la figura 13 se observa que tanto PPP como PRP estimularon los niveles de FN-EDA. En la figura 14 se puede observar la distribución de la FN-EDA en la superficie celular en células tratadas con PPP y PRP.

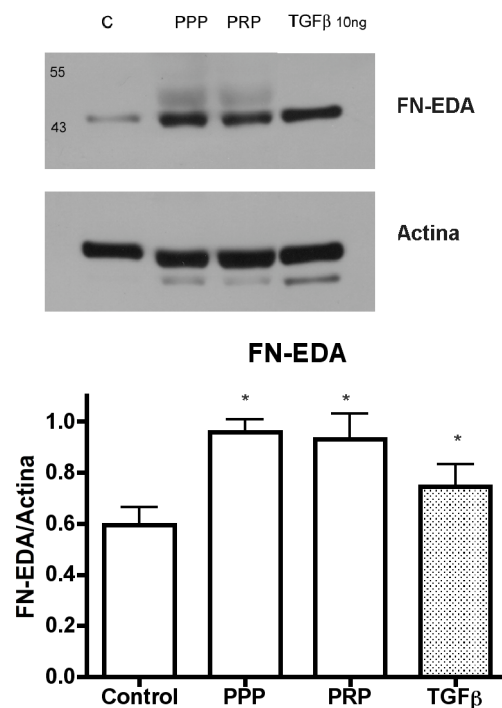


Figura 13. Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de Fibronectina ED-A en fibroblastos gingivales.

La imagen muestra un Western-blot para Fibronectina ED-A y Actina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de ambas fracciones plaquetarias durante 3 días. El gráfico muestra el promedio de 5 experimentos independientes en los cuales se indican los niveles de Fibronectina ED-A normalizados con respecto a la actina. Las barras indican el error estándar. $*= p < 0,05$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

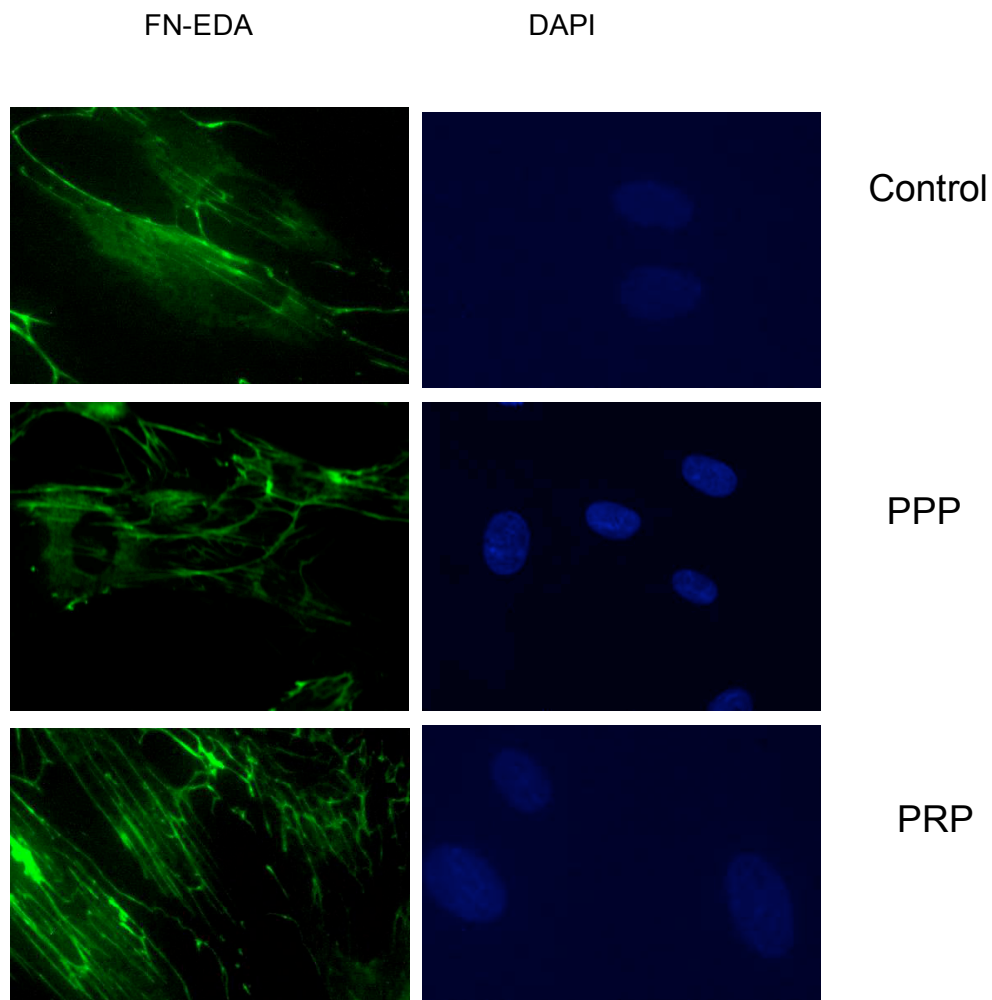


Figura 14. Localización de FN-ED-A en células tratadas con PPP y PRP.

Inmunofluorescencia para FN-EDA y tinción de núcleos con 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) en fibroblastos tratados con 25% de PPP y PRP durante 3 días. Aumento 60X.

II.3 Colágeno tipo I

El Colágeno tipo I es uno de los mayores componentes del tejido conectivo siendo los fibroblastos el tipo celular responsable de su biosíntesis y remodelación (Rhee & Grinnel, 2007). Considerando que la remodelación de la MEC involucra la producción de estas glicoproteínas, decidimos analizar la producción de colágeno tipo I en fibroblastos gingivales estimulados con PPP, PRP y TGF- β 1 actuando como control positivo. En la figura 15 se muestra que el estímulo con PPP y PRP indujo fuertemente los niveles de colágeno tipo I detectables en el lisado celular. Es destacable que el estímulo con TGF- β 1 fue menos efectivo que los factores plaquetarios en inducir cambios en los niveles de colágeno tipo I.

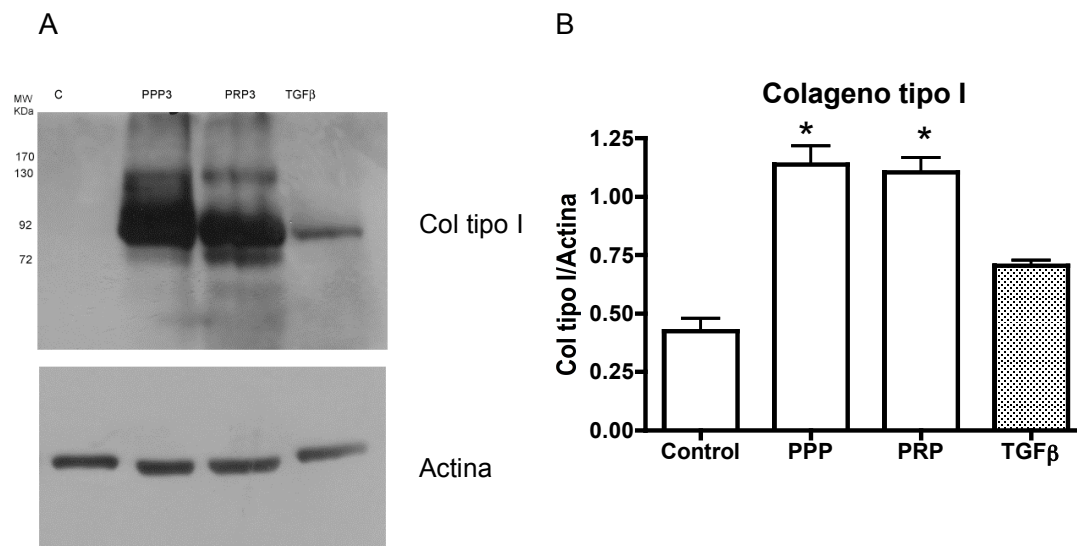


Figura 15 Efecto de PRP y PPP sobre los niveles de colágeno tipo I en fibroblastos gingivales

A. La imagen muestra un Western-blot para Colágeno tipo I y Actina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de ambas fracciones plaquetarias durante 3 días. Como control de activación de la expresión de colágeno se utilizó 10ng/ml de TGF β . La banda entre 130-140KDa corresponde al precursor de Col 1A1 y la banda entre 70-90 KDa corresponde al Col1A1 maduro. **B.** El gráfico muestra el promedio de 6 experimentos independientes en los cuales se indican los niveles de colágeno tipo I. Las barras indican el error estándar. *= $p < 0,05$ indica diferencias significativa con respecto al control (Test de Dunnett).

La **HSP47** (Heat shock protein 47, proteína de choque térmico 47) es una proteína inhibidora de serín proteasas, que actúa en la células como chaperona de colágeno. Con el propósito de evaluar si los cambios observados en la expresión de colágeno I se acompañaban de cambios en su proteína chaperona, evaluamos la producción de HSP-47 bajo el estímulo de PPP y PRP. Como se observa en la Figura 16A y B la incubación con factores plaquetarios no mostró un incremento en los niveles de esta proteína, medida a través de Western-blot e inmunofluorescencia. Los datos derivados del Western-blot fueron cuantificados y su análisis estadístico no mostró diferencias significativas con respecto al control (datos no mostrados).

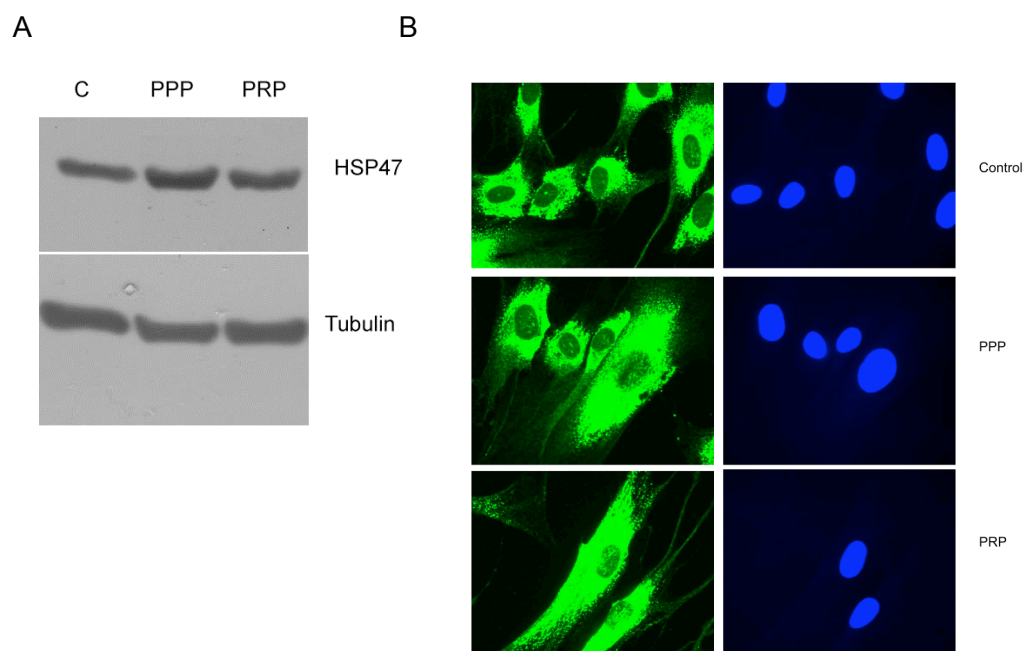


Figura 16 Efectos de PPP y PRP sobre los niveles y localización de HSP-47.

A. Expresión de HSP-47 en células tratadas con PPP y PRP durante 72 h medida por Western-blot. Como control de carga se utilizó Tubulina. **B** Inmunofluorescencia para HSP-47 y tinción de núcleos con DAPI. Aumento 60X.

II.4 Periostina

Periostina corresponde una proteína extracelular secretada por fibroblastos, expresada predominantemente en tejidos conectivos ricos en colágeno que están sometidos a constante estrés mecánico, tales como las válvulas cardíacas, tendones, cornea y ligamento periodontal. Se ha observado además que Periostina está involucrada en la fibrillogénesis de Colágeno y en la mantención de la estabilidad mecánica del ligamento periodontal (Norris et al, 2007). Por esta razón se analizó la producción de Periostina bajo el estímulo de PPP y PRP. En la Figura 17 se observa tanto PPP como PRP indujeron fuertemente los niveles de Periostina.

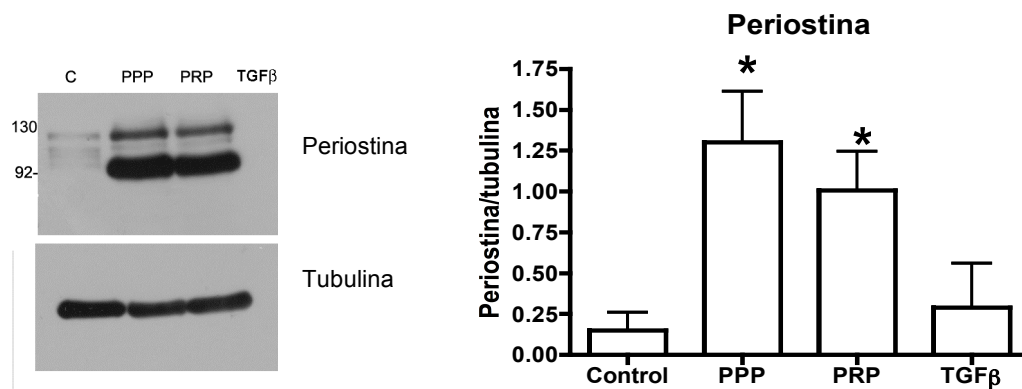


Figura 17 . Efectos de PPP y PRP sobre los niveles de Periostina.

A. La imagen muestra un Western-blot para Periostina y tubulina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de ambas fracciones plaquetarias durante 3 días. Como control de producción de la expresión de colágeno se utilizó 10ng/ml de TGFβ. **B.** El gráfico muestra el promedio de 6 experimentos independientes en los cuales se indican los niveles de Periostina. Las barras indican el error estándar. *= $p < 0,05$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

Presencia de moléculas en estudio en PPP y PRP

Considerando que las fracciones de origen plaquetario (PPP y PRP) pudiesen contener las proteínas estudiadas (Colágeno tipo I, TIMP-2, Actina) se analizó mediante Western-blot la presencia de éstas en los respectivos preparados. La figura 18 muestra que Colágeno tipo I y Actina no se encontraban en PPP ni PRP. Sin embargo, si se pudo identificar la presencia de TIMP-2 en estos preparados.

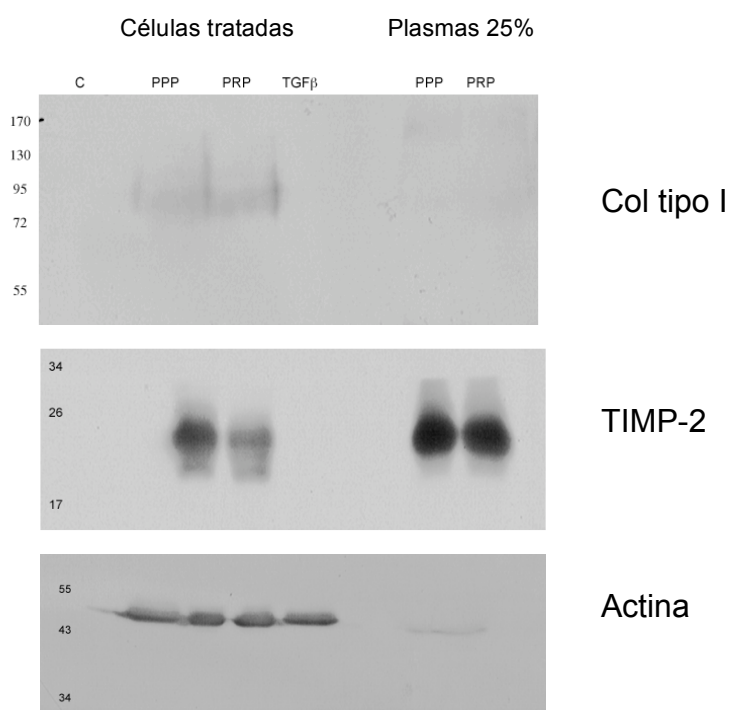


Figura 18. Expresión de Col tipo I, TIMP-2 y Actina en los PRP y PPP.

Inmunoblot para Colágeno, TIMP-2 y Actina en células tratadas con PRP, PPP y TGF-β1 y en los plasmas diluidos en medio al 25% (v/v).

La única proteína encontrada en los plasmas fue TIMP-2, hallazgo que coincide con lo reportado en la literatura (Guo et al, 2006). Para corroborar que los cambios de expresión de proteínas observados, eran debido a un aumento en la expresión y no a la presencia de éste en los plasmas, se evaluó la inducción del mRNA para α -SMA y TIMP-2 mediante RT-PCR semi-cuantitativo. En la figura 19 se muestra que en el caso de α -SMA, tanto PPP como PRP indujeron la expresión del mRNA. Para el caso de TIMP-2, la respuesta fue positiva para ambos, siendo mayor en el caso de PRP.

Expresión de mRNA para α -SMA y TIMP-2

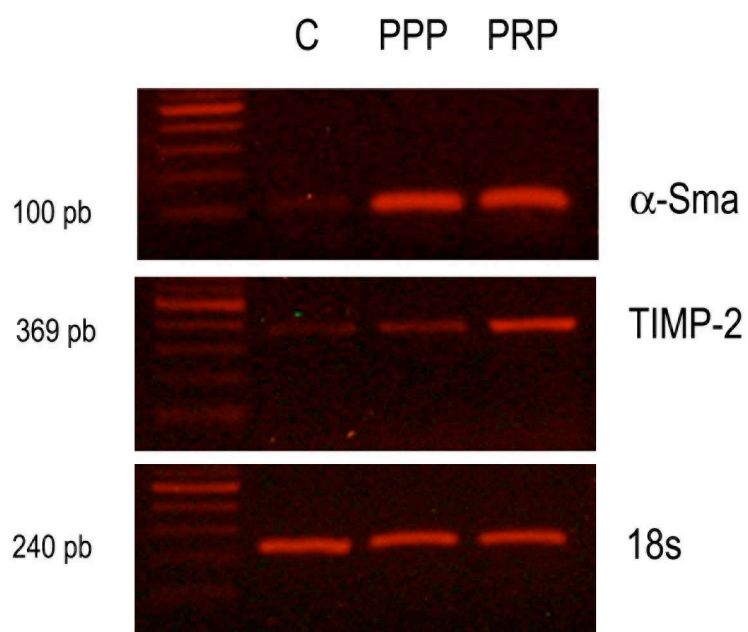


Figura 19: PRP y PPP inducen la expresión de mRNA de α -SMA y TIMP-2

RT-PCR para α -SMA, TIMP-2 y rRNA 18S en fibroblastos gingivales tratados durante 8 horas con 25% de PRP y PPP.

III. Migración

III.1 Ensayo de migración desde explantes de tejido gingival.

Durante la reparación de heridas, la migración celular es un evento crítico para repoblar la zona dañada en el tejido y permitir así la reparación. Con este propósito se evaluó la capacidad de PPP y PRP para estimular la migración celular a partir de un explante de tejido gingival. Para esto se utilizaron explantes de encía que fueron cultivados al interior de un film de colágeno. A su vez, estos cultivos fueron expuestos a 25% de PPP o PRP. Como control positivo se utilizó SFB al 10%. En la figura 20 se puede observar que tanto PPP y PRP pudieron estimular la migración de fibroblastos desde el explante hacia la matriz colágena.

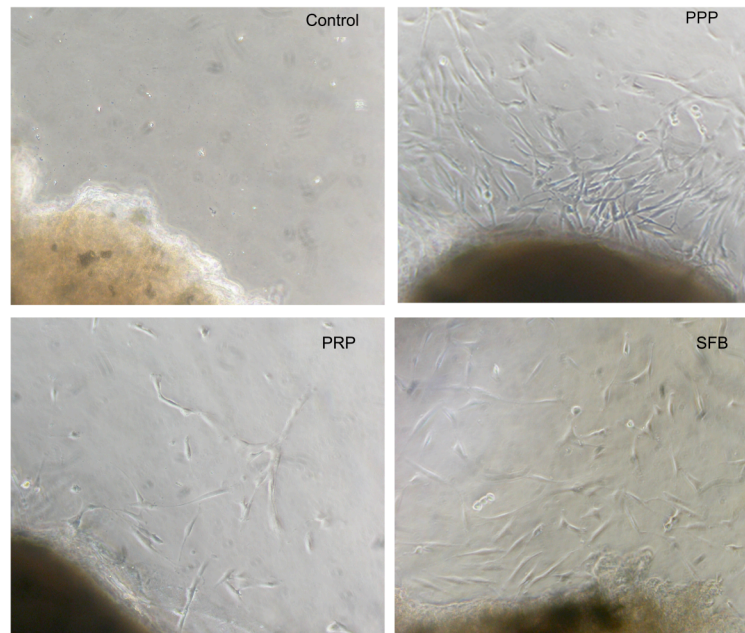


Figura 20 Efectos de PPP y PRP sobre la migración de fibroblastos desde explantes de tejido gingival.

Los explantes de tejido gingival fueron incorporados al interior de un film de colágeno (100 $\mu\text{g/mL}$) y estos cultivos fueron incubados durante 6 días con 25% de PPP o PRP. Como control positivo de migración se usó SFB al 10%. Aumento 10X.

III.2 Ensayo de migración celular en matrices tipo nido.

Se realizaron ensayos de migración en nido en los cuales los fibroblastos son incorporados al interior de un gel de colágeno (1 mg/mL) y luego este gel ya polimerizado es incorporado en un segundo gel de colágeno libre de células. En el medio de cultivo se agregó 25% de PPP o PRP, SFB al 10% y 10 ng/mL de TGF- β 1 como estímulo quimiotáctico. El resultado de este experimento mostró que tanto PPP como PRP estimularon significativamente la migración celular hacia el segundo gel. Si bien, PRP indujo una mayor respuesta migratoria en relación al PPP, esta no mostró diferencias estadísticamente significativas.

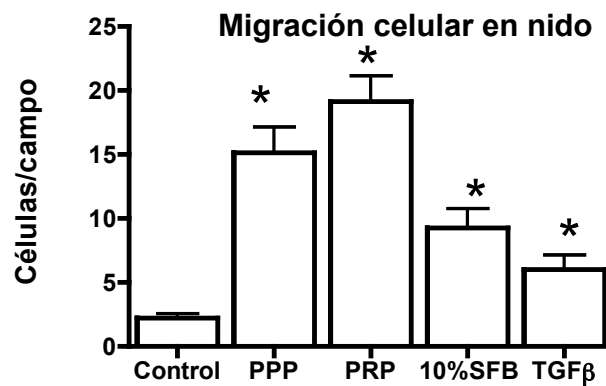
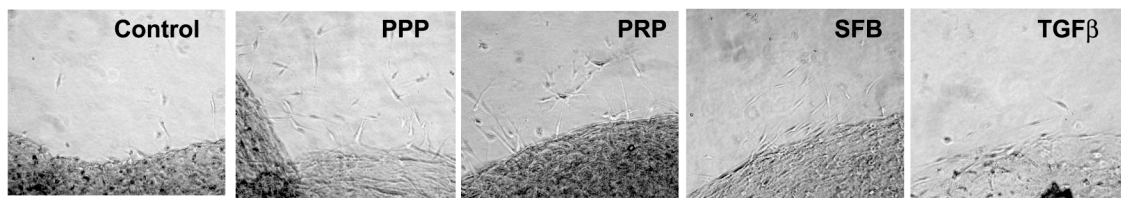


Figura 21: Efectos de PPP y PRP sobre la migración celular en ensayos tipo nido.

A Fibroblastos gingivales fueron cultivados al interior de geles de colágeno y luego incorporados en un segundo gel libre de células. El medio de cultivo fue condicionado con las fracciones plaquetarias. Luego de 24 h las células se fijaron y se cuantificó todo el contorno del gel de colágeno. **B** El gráfico muestra el promedio de células por campo. Las barras indican el error estándar. Cada imagen es representativa de un campo de conteo. *= $p < 0,05$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

III.3 Ensayo de invasión en sistema bicameral (Transwell).

Este ensayo permitió cuantificar la capacidad invasiva de los fibroblastos gingivales en respuesta al estímulo quimiotáctico de los plasmas. Para esto las células fueron sembradas en la parte superior de un sistema bicameral. Para que las células migren del compartimiento superior al inferior, deben sortear un filtro condicionado con una matriz extracelular reconstituida (Matrigel). Como estímulo quimiotáctico se utilizó 25% de PPP, PRP y SFB al 10% ubicados en el compartimiento inferior. Como la muestra la figura 22, tanto PPP, PRP y SFB estimularon la migración e invasión celular. Si bien, PRP indujo una mayor respuesta migratoria en relación al PPP, esta no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

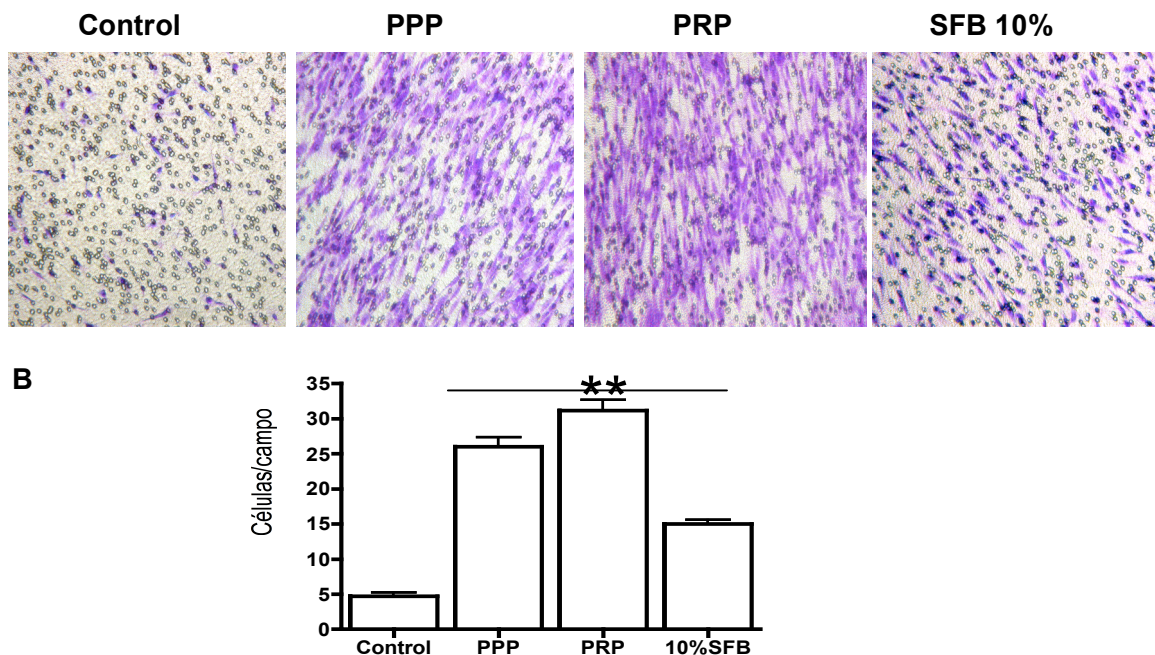


Figura 22. Efecto de PRP y PPP sobre la invasión y migración de fibroblastos gingivales humanos.

A. Se evaluó la migración de fibroblastos en un sistema bicameral en el cual se utilizó 25% PRP, 25% PPP y SFB al 10% como estímulo quimiotáctico. El filtro del sistema bicameral fue pre-tratado con una matriz reconstituida (Matrigel 10 μ g/mL). Luego de 16 h, las células remanentes en el compartimiento superior fueron eliminadas y las células migratorias fueron teñidas con cristal violeta. La imagen es representativa de las células que migraron en los Transwell. **B** El gráfico muestra el promedio de células que migraron por área. Las barras indican el error estándar. **= $p < 0,01$ indica diferencias significativas con respecto al control (Test de Dunnett).

IV. Papel de TGFβ1 en las respuestas celulares inducidas por PPP y PRP

IV.1 Niveles de TGF-β1 presentes en PRP y PPP

Considerando el potencial papel de TGF-β1 en la inducción del fenotipo miofibroblástico y en la remodelación de la MEC durante la reparación de heridas, decidimos evaluar la concentración de este factor de crecimiento en PRP y PPP derivado de la sangre periférica de los individuos en estudio. En la figura 23 se representa la concentración promedio de TGF-β1 en PPP y PRP. Estos valores fueron 4,4 veces mayor en PRP en comparación con PPP.

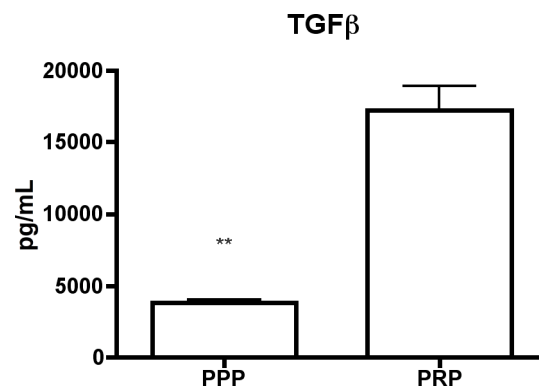


Figura 23. Niveles de TGFβ1 en PRP y PPP.

El gráfico muestra el promedio y error estándar de la cuantificación por ELISA de TGFβ1 en PRP y PPP de los 6 voluntarios. Las barras indican el error estándar. **= $p < 0,01$ indica diferencias significativas entre PPP y PRP (Test de Dunnett).

IV.2 Papel de TGF- β 1 presente en PRP y PPP en la expresión de α -SMA y FN-EDA.

Con el propósito de evaluar el papel de TGF-beta presente en las preparaciones de origen plaquetario y su papel como inductor de la diferenciación miofibroblástica, decidimos utilizar 2 estrategias experimentales. Se utilizó el inhibidor de la actividad quinásica del receptor tipo I de TGFbeta (TBR-I), SB431542, con el propósito de definir si es que el TGF- β 1 presente en el PRP o PPP era responsable de la producción del marcador de miofibroblastos α -SMA. Como se observa en la figura 24, el mencionado inhibidor redujo parcialmente el efecto de PPP y PRP sobre la producción de α -SMA. El efecto de SB fue claro al inhibir la actividad específica de TGF- β 1 recombinante sobre α -SMA.

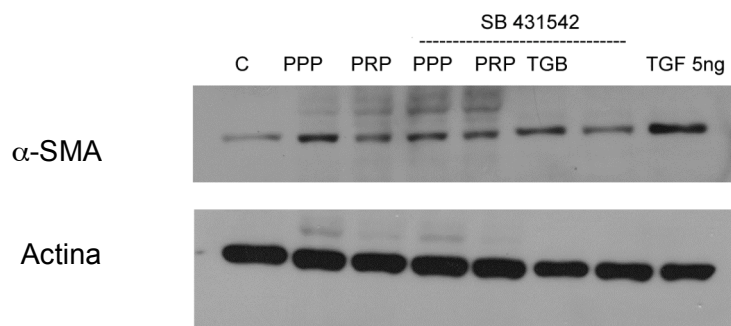


Figura 24 Efecto del inhibidor de TBRI (SB 431542) sobre los niveles de α -SMA.

A Western-blot para α -SMA y Actina a partir del lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 25% PPP y PRP durante 3 días y/o pre-tratadas con el inhibidor de TBRI (SB 431542) 10 μ M.

Considerando que el inhibidor de TBRI sólo logró reducir de manera parcial el estímulo de PRP y PPP sobre la expresión de α -SMA, decidimos utilizar un inhibidor de activina. Este corresponde a un factor soluble capaz de unirse a ActRIIB y ALK 4 y activar su señalización. Este ligando, al igual que TGF- β 1 es capaz de inducir la señalización vía Smad 2/3, fenómeno coincidente con la señal activada por TGF- β 1 (Shi & Massagué , 2003). Como se observa en la figura 25, la adición de folistatina al estímulo generado por PRP y PPP no logró alterar los niveles de expresión de los marcadores de miofibroblasto α -SMA y FN-EDA. Más aun, la combinación de folistatina asociada al inhibidor de TBRI SB 431542, no logró modificar la expresión de los marcadores con respecto a la inhibición parcial lograda por SB 431542. Estos datos sugieren entonces que activina no estaría jugando un papel en la diferenciación de miofibroblastos inducida por PRP y PPP. Se realizaron experimentos con mayores concentraciones de folistatina (0,5 a 2,0 μ g/mL), no observándose cambios en los niveles de los marcadores en estudio.

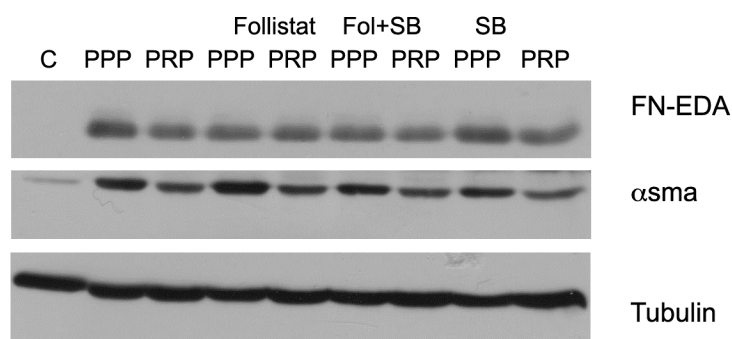


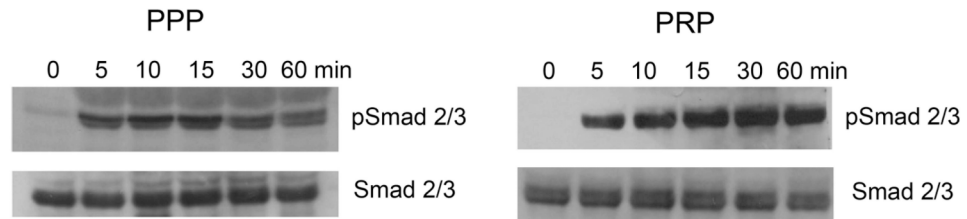
Figura 25. Efecto del inhibidor de activina – folistatina- sobre los niveles de los marcadores de miofibroblastos α -SMA y FN-EDA.

Inmuno blot para FN-EDA, α -SMA y tubulina (control de carga) en fibroblastos gingivales previamente tratados durante una hora con 0,5 μ g/mL de folistatina (bionutralizador de activina) y el inhibidor de TBRI SB 431542 10 μ M. Las células se incubaron durante 3 días con 25% (v/v) de PRP y PPP.

IV.3 Efectos de PRP y PPP sobre la activación de la ruta Smad 2,3.

TGF- β 1 inicia su señalización por la unión de sus ligandos (TGF- β , activina, inhibina, Nodal) a los receptores TBRI y TBRII. Esta unión permite la fosforilación del receptor II al dominio kinasa del receptor I, la cual permite la propagación de la señal a través de la fosforilación de las proteínas Smad (Lönn P et al, 2009). Considerando que la concentración de TGF- β 1 en PRP y PPP mostró diferencias significativas (4,4 veces mayor en PRP) y que la respuesta en los niveles de los marcadores de diferenciación miofibroblástica era similar, decidimos evaluar la activación de la vía Smad 2,3 como testigo de la actividad de TGF- β en PRP y PPP. Se observó que tanto PRP como PPP indujeron una potente fosforilación de Smad 2,3 que se inició a las 5 min de estimulación y se mantuvo activa por 60 min (Figura 26 A). Experimentos adicionales permitieron observar que Smad 2,3 se mantenía activo a las 24 h de estimulación con PRP y PPP (datos no mostrados). En la figura 26B se muestra la fosforilación inducida por TGF- β 1 recombinante versus la generada por PPP a los 5 min. Considerando que la concentración de TGF- β 1 en el PPP fue de aproximadamente 4 ng/mL, se estima que la concentración final de estímulo de TGF- β 1 en el PPP fue de 1,25 ng/mL (25%). A modo de control de activación de la vía Smad 2,3, se realizó un estímulo con 5 ng/mL de TGF- β 1 recombinante. Se pudo detectar que la fosforilación ejercida por el concentrado plaquetario fue de mayor intensidad que la lograda con TGF- β 1 recombinante. Este resultado sugiere la presencia de otros activadores de TGF- β 1 en el PPP o de moléculas que actúen sinérgicamente potenciando la respuesta de la vía Smad 2,3. Se realizaron además estímulos a concentraciones equivalentes para TGF- β 1, utilizando el factor recombinante, PRP y PPP. En estos casos la fosforilación de Smad 2,3, inducida por PRP y PPP fue mayor a la observada con TGF- β 1 recombinante,.

A



B

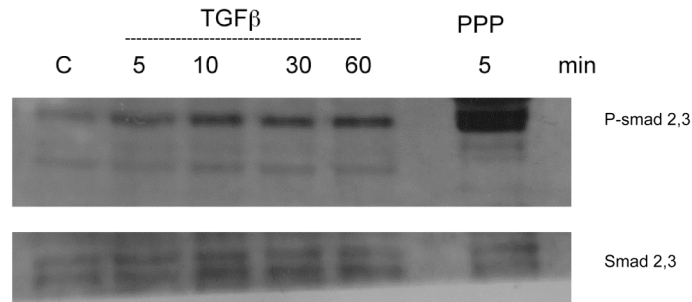


Figura 26. Efecto de PPP y PRP sobre la fosforilación de la vía Smad 2,3

A Western-blot de lisado de fibroblastos gingivales estimulados con 25% de PPP y PRP utilizando anticuerpos con p-Smad 2,3 y Smad 2,3 como control de carga. **B** Western-blot de lisado de fibroblastos gingivales estimulados con 5 ng/mL de TGF-β1, 25% de PPP utilizando anticuerpos con p-Smad 2,3 y Smad 2,3 como control de carga.

Finalmente decidimos evaluar si la activación de Smad 2,3 por PRP y PPP podía ser atenuada por el inhibidor de TBRI (SB 431542) o por el neutralizador de activina folistatina (Figura 26). El análisis de estos resultados mostró que SB logró una reducción parcial en la fosforilación de Smad 2,3 a los 30 min de estímulo. Para el caso de folistatina, no se logró observar ningún efecto en la activación de la mencionada ruta.

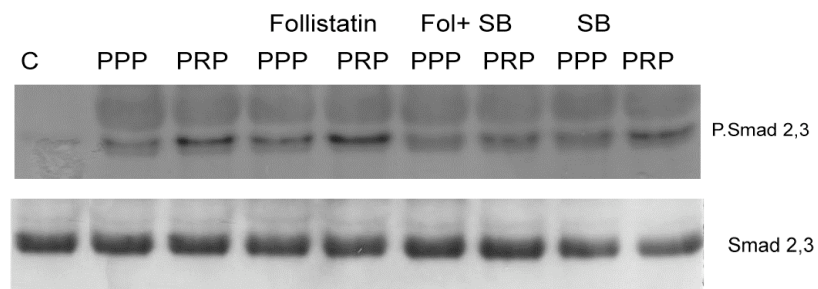


Figura 26. Efecto del inhibidor de TBRI y del neutralizador de activina sobre la activación de Smad inducida por PPP y PRP.

A Western-blot de lisado de fibroblastos gingivales estimulados durante 30 min con 25% de PPP y PRP utilizando anticuerpos contra p-Smad 2,3 y Smad 2,3 (control de carga). Se utilizaron los inhibidores folistatina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y SB 431542 (10 μM).

DISCUSIÓN

El PRP ha sido utilizado en clínica con el propósito de mejorar los fenómenos de reparación y/o regeneración tisular en diversas aplicaciones clínicas tales como cirugía ortopédica y reconstructiva, lesiones ulcerativas de la piel, cirugía plástica, cirugía ocular, reconstrucción de tejidos maxilofaciales y regeneración periodontal (Dohan Ehrenfest et al, 2009). Sin embargo, los estudios clínicos no han mostrado consistencia en sus resultados (Lacci & Darnick 2010), evidenciando el escaso conocimiento que tenemos acerca de las respuestas celulares desencadenadas por el PRP (Dohan Ehrenfest et al, 2009).

El presente estudio buscó caracterizar el efecto que tiene la aplicación de PRP y de PPP sobre respuestas celulares relacionadas con el cierre de heridas y la remodelación del tejido de granulación, fenómenos que hasta el momento habían sido pobremente explorados. La remodelación y contracción del tejido de granulación es un evento clave en la reparación de heridas ya que facilita la reducción del volumen de la lesión original disminuyendo la exposición del tejido a agentes dañinos y favorece en último término el cierre de esta (Martin, 1997). Nuestros resultados muestran que ambas fracciones derivadas de plaquetas son capaces de estimular la contracción de geles de colágeno a través de un mecanismo que involucraría la actividad de MMPs y del citoesqueleto de actina. Estos resultados son originales y apuntan a un mecanismo de acción a través del cual, tanto PRP como PPP podrían promover la reducción del volumen inicial de la herida y la remodelación de este tejido. Paralelamente se analizó el efecto que tienen PRP y PPP sobre la inducción de la migración celular, la diferenciación de miofibroblastos y la producción de moléculas de MEC tales como colágeno y periostina. Nuestros resultados muestran que tanto PRP como PPP pueden estimular la migración celular, la diferenciación de miofibroblastos y la producción de moléculas de MEC, lo que pone en evidencia el potencial efecto positivo de estos derivados plaquetarios sobre la reparación tisular.

Papel de MMPs, estimuladas por PRP y PPP, en la remodelación del tejido de granulación.

La contracción de geles de colágeno, estimulada por PRP y PPP, resultó ser dependiente de la actividad de MMPs. Nuestros resultados muestran que tanto PRP como PPP estimulan la producción de la colagenasa MT1-MMP y de su inhibidor TIMP-

2, lo que sugiere que los factores solubles presentes en éstos preparados pueden ejercer un efecto estimulador sobre la cascada proteolítica envuelta en la remodelación del tejido de granulación. Es importante mencionar que otras proteasas como MMP-3 (McKeown et al, 2007) y uroquinasa (Smith & Martínez, 2006) han sido vinculadas a los fenómenos de remodelación del tejido de granulación, dato que sugiere que el estímulo de PRP y PPP podría activar otros ejes proteolíticos involucrados en la reducción del volumen inicial de la herida. Es importante destacar que MT1-MMP es una proteasa de transmembrana que cumple un papel clave en la degradación de colágeno a nivel pericelular (Holmbeck et al, 1999) y además en el procesamiento de factores de crecimiento y citoquinas que regulan la respuesta del tejido conectivo como es el caso de Conective Tissue Growth Factor (CTGF) (Overall et al, 2004). Pudimos observar además que la producción de MT1-MMP se vio asociada a la del inhibidor TIMP-2. Esto permite argumentar que la actividad derivada de la proteasa podría estar de alguna manera controlada por uno de sus inhibidores fisiológicos y de esta forma podría derivar en una remodelación balanceada del tejido en reparación. Es importante destacar además que alteraciones en el balance entre MMPs y sus inhibidores han sido asociados a la destrucción de tejidos conectivos como ocurre en el caso de la enfermedad periodontal (Pozo et al, 2005).

Efecto de la modulación del citoesqueleto de actina por PRP y PPP en la remodelación del tejido de granulación.

La contracción de geles de colágeno, estimulada por PRP y PPP, fue dependiente de la actividad del citoesqueleto de actina. Nuestros resultados muestran además que tanto PRP como PPP estimulan la activación de la GTPasa RhoA, la cual es crucial para el desarrollo de las fibras de estrés (Ridley, 2001). A su vez, ambos preparados estimularon la formación de fibras de actina, siendo mayor la respuesta para PPP. Se observó además un estímulo en el tamaño de los contactos focales formados bajo el efecto de PPP y PRP. Este efecto podría potenciar los mecanismos de interacción entre células y la MEC del tejido de granulación, facilitando los procesos de remodelación y de contracción de este tejido que así contribuirían al cierre de la herida.

Efecto de PRP y PPP sobre la migración celular.

La migración celular es un proceso clave en la reparación puesto que es crítica para el repoblamiento del coágulo sanguíneo y tejido de granulación (Martin P, 1997). En esta tesis la migración celular fue evaluada mediante 3 modelos celulares: i) migración desde

explantes, ii) migración en nido y iii) a través del ensayo bicameral Transwell. Aunque los estímulos inducidos por PRP sobre la migración celular fueron superiores, estos no alcanzaron a ser estadísticamente distintos de los observados en el caso del estímulo con PPP (figura 20, 21 y 22). Algunos factores de crecimiento como el PDGF, IGF y TGF- β 1 han sido involucrados en la inducción de una respuesta quimiotáctica que estimula la migración hacia el sitio de la herida (Postlethwaite et al, 1987; Nishimura & Terranova, 1995). Es importante destacar al respecto que PDGF-AA, -AB, -BB, IGF y TGF- β 1 han sido detectados en el PRP (Lacci & Darnick, 2010). En el caso de TGF β 1 los niveles encontrados en PRP y PPP fueron de 18, 8 y 4,1 ng/mL respectivamente, siendo éstas concentraciones similares a las encontradas por los autores Schnabel et al (2007). Por otro lado, este último no pudo detectar PDGF-BB en el PPP. Dado que PPP y PRP inducen respuestas quimiotácticas similares en los fibroblastos gingivales, esto sugiere la posibilidad de que las concentraciones encontradas en ambos preparados serían suficientes para inducir o gatillar un estímulo quimotáctico.

Efectos de PPP y PRP sobre la diferenciación de miofibroblastos y la producción de MEC.

Los miofibroblastos cumplen un papel clave en la reconstrucción de los tejidos conectivos dañados (Hinz, 2007). Estas células se caracterizan por la expresión de α -SMA, una isoforma de actina que es capaz de facilitar los fenómenos de contractilidad celular en fibroblastos (Hinz et al, 2001, Hinz & Gabianni 2003) proceso que podría contribuir al fenómeno del cierre de heridas. La expresión de ésta isoforma está altamente regulada por la actividad de TGF β 1, la expresión de Fibronectina ED-A (variante por splicing alternativo de la FN), y el microambiente mecánico que rodea la célula (Tomasek et al, 2002). Nuestros datos muestran que tanto PRP como PPP estimulan la producción de α -SMA y de FN-EDA (Figura 12 y 13), lo que sugiere que ambas fracciones derivadas de plaquetas promueven la diferenciación del fenotipo miofibroblástico. Además, es interesante destacar, que ambos estimulan de manera similar la producción de colágeno tipo I y Periostina (Figura 15 y 17). El colágeno es el mayor componente estructural de los tejidos conectivos periodontales y periostina está involucrada en los procesos de fibrillogénesis y de estabilidad mecánica de los tejidos conectivos periodontales (Rios et al, 2008). Estos datos sugieren que tanto PRP como PPP podrían estimular de manera similar la reconstitución de la MEC gingival dañada por diferentes procesos.

Concentración de factores de crecimiento en PRP y PPP y sus efectos sobre la función celular.

Un tema aun no resuelto en el estudio de los efectos del PRP sobre la reparación tisular se relaciona con la concentración de plaquetas y de factores solubles derivados de ellas, necesarios para inducir la mejor respuesta celular. Al respecto, diferentes estudios han mostrado que PRP puede estimular la proliferación celular en osteoblastos (Clausen et al, 2006), fibroblastos y células del ligamento periodontal (Annunziata et al, 2005). Sin embargo, otros estudios han mostrado resultados contradictorios que indican que PRP no tendría necesariamente un efecto estimulador sobre la proliferación y diferenciación en osteoblastos (Cenni et al, 2005; Slapnicka et al, 2008). Se ha propuesto que las funciones celulares no necesariamente se promueven por altas concentraciones de factores de crecimiento. Graziani et al (2006) observó que la mayor proliferación celular y diferenciación osteoblástica era estimulada con una concentración de plaquetas equivalente a 2,5 veces la detectada en sangre. En coincidencia con esto, las concentraciones más altas de plaquetas mostraron efectos negativos sobre la proliferación celular (Graziani et al, 2006). Los autores Schnabel et al. (2007) analizaron la respuesta de explantes de tendones frente a PRP y PPP observando que no todas las respuestas eran inducidas por la presencia de altas concentraciones de factores de crecimiento. Uno de los argumentos que ellos aducen es que la cantidad de factores de crecimiento presentes en las fracciones derivadas de plaquetas pueden encontrarse, en algunos casos, en valores superiores a la concentración fisiológica necesaria para alcanzar la mejor respuesta celular. La mayoría de los estudios se centran en las respuestas celulares inducidas por PRP. Sin embargo, el PPP normalmente se descarta debido a la baja concentración de factores de crecimiento presentes en él. Es interesante agregar que un estudio clínico reciente no mostró diferencias en la reparación de lesiones periodontales tratadas con PRP o PPP (Yilmaz et al., 2010), lo que refuerza que éste último preparado podría tener un efecto terapéutico que ha sido poco explorado.

TGF- β como mediador de las respuestas celulares del PRP y PPP

Los ligandos de la familia de TGF- β (miostatina, activina, TGF- β 1, Nodal y BMP) inician su señalización uniéndose al receptor de TGF-beta (T β RII). Luego de esta unión, la señalización se propaga a través de la fosforilación de T β RI y de las proteínas Smad 2/3

(Shi & Massague 2003). Nuestra estrategia fue la de utilizar la fosforilación de Smad 2/3 como un indicador de la presencia de TGF β 1 en PRP y PPP. Si bien, la concentración de TGF β 1 presente en PRP fue 4,4 veces superior a la encontrada en PPP, ambos preparados fueron capaces de fosforilar las Smads. Es necesario hacer notar que esta respuesta fue levemente superior en el caso del PRP en comparación con la inducida por PPP, pero no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos preparados. Por otra parte, quisimos descartar el efecto de otros potenciales ligandos de la familia de TGF- β como es el caso de activina. Para esto utilizamos un inhibidor natural de activina conocido como folistatina. Sin embargo, la utilización de folistatina no alteró la producción de α -SMA ni la activación de Smad 2/3. En el modelo de músculo esquelético dañado se ha observado que la proliferación miogénica sólo ocurre cuando existen bajas concentraciones de TGF β 1 (0,5 ng/ml) (Carlson et al, 2010). Por otro lado, a concentraciones superiores (5 ng/mL), TGF β 1 inhibe la respuesta proliferativa de las células satélites. En concordancia con este concepto, nuestros datos sugieren que concentraciones muy elevadas de factores de crecimiento como podría ser el caso de TGF β 1, no necesariamente están asociadas a una mejor respuesta biológica.

Potencialidad terapéutica del PRP y PPP

Si bien el PRP ha sido utilizado mayoritariamente en la reconstitución de tejidos duros como hueso y tejidos periodontales, estudios recientes han mostrado un efecto particularmente positivo en los fenómenos de cierre de heridas en tejidos blandos que incluyen la mucosa oral y gingival (Lindeboom et al., 2007; Torres et al., 2010). Es por esto que en la presente tesis se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos gingivales de origen humano. Por otro lado, tanto el PRP y PPP son obtenidos a partir de la sangre del propio paciente que recibirá la intervención, lo que pone en evidencia una importante ventaja biológica al reducir el riesgo de contagio de enfermedades transmisibles como SIDA, hepatitis o reacciones inmunogénicas que existen producto de un aloinjerto o xenoinjerto (Foster et al, 2009). Es importante considerar que el uso de PRP en lesiones ulcerativas en diabéticos ha mostrado resultados promisorios (Lacci & Darnick, 2010). Este tipo de aplicaciones podrían ser evaluadas en los tejidos orales considerando el importante impacto que tiene esta enfermedad en este territorio del organismo (Abiko & Selimovic, 2010).

CONCLUSIONES

- La presente tesis muestra que los factores solubles derivados de PRP y PPP pueden ejercer un efecto similar en variadas respuestas celulares involucradas en la reparación de tejidos gingivales.
- Las respuestas estimuladas por PRP y PPP incluyen la remodelación de geles de colágeno, producción de proteasas y sus inhibidores, remodelación del citoesqueleto de actina, migración celular y diferenciación miofibroblástica.
- La remodelación de geles de colágeno estimulada por PRP y PPP es dependiente de la actividad del citoesqueleto de actina y de MMPs.
- Si bien los niveles de TGF- β 1, resultaron ser 4 veces superiores en PRP en relación a PPP, las respuestas celulares fueron similares, particularmente en aquellas vinculadas a la actividad de TGF- β 1 (producción de α -SMA, producción de colágeno tipo I y activación de Smad 2,3), lo que sugiere que las concentraciones de factores disponibles en estos preparados son suficientes para inducir respuestas celulares compatibles con la reparación de tejidos.

Conclusiones finales

Tomados en su conjunto, nuestros resultados muestran que el estímulo de PRP y PPP pueden promover la remodelación y contracción del tejido en reparación a través de la producción y actividad de MMPs y del citoesqueleto de actina. Además estos factores pueden favorecer la reparación promoviendo la producción de moléculas estructurales de MEC tales como colágeno y periostina, a través de la promoción de la diferenciación de miofibroblastos y de la migración celular al tejido dañado. Este efecto podría ser útil en la promoción de la reparación de tejidos orales, particularmente en situaciones que comprometen gravemente los fenómenos de reparación como ocurre en pacientes diabéticos.

REFERENCIAS

Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. (2006). New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* **24**: 227-234.

Annunziata M, Oliva A, Buonaiuto C, Di Feo A, Di Pasquale R, Passaro I, Guida L. (2005). In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *J Periodontal Res* **40**: 489-495.

Arora PD, McCulloch C.(1994). Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* **159** (1) 161-75.

Assoian R, Komoriya A, Meyers CA, Millar DM , and Sport MB. (1983). The Journal of biological Chemistry. **258** (11) 7155-7160.

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. (2000). Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000* **24**: 28-55.

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

Bowers S, Banerjee I, Baudino TA. (2010). The extracellular matrix: at the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48** (3). 474-82

Bullard K M, Lund L, Mudgett J S, Mellin T N, Hunt T K, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda M J. (1999). Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Annals of surgery* **230** (2) 260 –26.

Butcher JT, Norris R, Hoffman S, Mjaatvedt CH, Markwald RR. (2007). Periostin promotes atrioventricular mesenchyme matrix invasion and remodeling mediated by integrin signaling through Rho/PI 3-kinase. *Developmental Biology* **302** : 256 – 266.

Cáceres M, Guerrero J, Martínez J. (2005). Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells. *Exp Cell Res* **309** (1) 229-38.

Carlson M, Conboy MJ, Hsu M. (2009). Relative roles of TGF- β 1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell* **8** (6) 676-89.

Celotti F, Colciago A, Negri-Cesi A, Pravettoni A, Zaninetti R, Sacchi MC. (2006). Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Wound repair and regeneration*. **14** (2) 195-202.

Cenni E, Ciapetti G, Pagani S, Perut F, Giunti A, Baldini N. (2005). Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontol* **76**: 323-328.

Chun T.H, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh K.T, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen E.D, Weiss S. J.(2004). MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol* **167** (4) 757-67.

Clausen C, Hermund NU, Donatsky O, Nielsen H, Osther K. (2006). Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. *Cells Tissues Organs* **184**: 68-75.

Dohan Ehrenfest D, Rasmusson L and Albrektsson T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology* **27** (3) 158-67

Elsdale, T., Bard, J. (1976). Collagen Substrata for Studies on Cell Behavior. *The Journal of Cell Biology*. **54**: 626-637.

Folgueras A, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* **48**: 411-424.

Foster T, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo S. (2009). Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine* **37** (11) 2259-72

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading. *Nature Cell Biology* **9** (12) 1392-1400.

Gamonal JA, Lopez NI, Aranda W. (1998). Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int J Dent* **48**: 96-103.

Gill SE, Parks WC. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 1334-1347.

Goldberg MT, Han Y-P, Yan C, Shaw MC, Garner WL. (2007). TNF- α suppresses α -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* **127**: 2645-2655.

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

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. (2006). The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* **17**: 212-219.

Grinnell F, Rocha L.B, Lucu C, Rhee S, Jiang H. (2006). Nested collagen matrices: A new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions *Exp Cell Res* **312** (1) 86-94.

Guo X Zhao WQ , Kondo C, Shimojo N, Yamashita K , Auki T , Hayakawa T. (2006). Tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and -2 (TIMP-2) are major serum factors that stimulate the TIMP-1 gene in human gingival fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1763** (3) 296-304.

Hakkinen L, Vitto VJ, Larvaja H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology* 2000 **24**:127-152.

Hamilton DW.(2008). Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal.* **2**: 9-17.

Hinz B, Celetta G, Tomasek J J, Gabbiani G, Chaponnier C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 2730 –2741.

Hinz B, Gabbiani G. (2003). Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Current Opinion in Biotechnology* **14** (5) 538-546.

Hinz B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127**: 526-537.

Hinz B. (2010). The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics* **43**: 146-155.

Holmbeck K Bianco P, Caterina J, Yamada S. (1999). MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**:81-92.

Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. (1999). Identification and Characterization of a Novel Protein, Periostin, with Restricted Expression to Periosteum and Periodontal Ligament and Increased Expression by Transforming Growth Factor *J Bone Miner Res* **14**(7):1239-49.

Jaffe AB, Hall A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol* **21**: 247-69.

Kavitha O Thampan RV. (2008). Factors influencing collagen biosynthesis. *J. Cell. Biochem.* **104** (4) 1150-1160.

Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H. (2005). In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor. *Journal of Periodontology* **76** (5) 760-7.

Lacci KM, Darnick A. (2010). Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med* **83** (1) 1-9.

Larsen M, Artym V, Greenand A, Yamada K M. (2006). The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* **18** (5) 463-71.

Larjava H, Heino J, Cari VM, Krusius T, Vuorio E. (1989). Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. *Journal of Dental Research* **68** (1) 20-25.

Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ. (2007). The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci* **12** :1475-1487.

McKeown S.R.W, Barnes JJ, Hyland PL, Lundy FT, Fray MJ, Irwin CR. (2007). Matrix Metalloproteinase-3 differences in oral and skin fibroblast.. *J Dent Res* **86** (5):457-462.

Martin P. (1997). Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* **276**: 75-81.

Massague J. (1987). The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* **49**:437-438.

Madlener M, Parks WC, Werb S. (1998). Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Physiological Inhibitors (TIMPs) Are Differentially Expressed during Excisional Skin Wound Repair. *Exp Cell Res* **242** (1) 201-210.

Nishimura F, Terranova VP. (1996). Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. *J Dent Res*. **75**: 986-992.

Nikolidakis D, Jansen J. (2008). The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **14** (3) 249-58.

Norris R, Damon B, Mironov V. (2007). Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J. Cell. Biochem.* **101** (3) 695-711.

Owen G Rh, Meredith DO, Richards RG. (2005). Focal adhesión quantification- A new assay of material biocompatibility: Review. *European Cells and Materials* **9**: 85-96.

Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, Connor A, Ewart T, Morrison CJ, Puente X, López-Otín C, Seth A. (2004). Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem* **385** (6) 493-504.

Page RC, Schroeder HE. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* **33**: 235-246.

Page-McCaw A, Ewald A, Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **8** (3) 221-33.

Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. (1987). Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **165**: 251-256.

Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldívar M, Puente J, Martínez B, Gamonal J. (2005). Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res.* **40** (3) 199-207.

Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Fens JQ. (2008). Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *Journal Periodontol* **79** (8) 1480-90.

Rhee S, Grinnell F. (2007). Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59** (13) 1299-305.

- Ridley AJ. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Science* **114**: 2713-2722.
- Rozman P, Bolta Z. (2007). Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* **16** (4) 156-65.
- Santos-Martínez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. (2008). Role of metalloproteinases in platelet function. *Thrombosis Research* **121**: 535–542.
- Sastry S and Burridge K. (2000). Focal adhesions: a nexus for intracellular signalling and cytoskeletal dynamics. *Experimental Cell Research* **261**:25-36.
- Schaffer CJ, Nanney LB. (1996). Cell biology of wound healing. *Int Rev Cytol* **169**: 151-181.
- Shi Y, Massague J. (2003). Mechanisms of TGF signaling from cell membrana to the nucleus. *Cell* **113**: 685–700.
- Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. (2008). Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg* **66**: 297-301.
- Smith PC, Cáceres M, Martínez J. (2006). Induction of the myofibroblastic phenotype in human gingival fibroblasts by transforming growth factor-beta1: role of RhoA-ROCK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *J Periodont Res* **41**: 418–425.
- Smith PC, Martínez J.(2006). Differential uPA expression by TGF-beta1 in gingival fibroblasts. *J Dent Res* 85(2):150-5.
- 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**: 349-363.

Torres J, Tamimi F, Alkhraisat MH, Manchón A, Linares R, Prados-Frutos JC, Hernández G, López Cabarcos E. (2010). Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone. *J Clin Periodontol* 37: 943-951.

Tsirogianni A, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. (2006). Wound healing: immunological aspects. *Injury* 37 (1) 5-12.

Werner S, Grose R. (2002). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870.

Yılmaz S, Kabaday C, Ipci SD, Cakar G, Kuru B. (2010) Treatment of Intrabony Periodontal Defects With Platelet Rich Plasma Versus Platelet Poor Plasma Combined With a Bovine Derived Xenograft: A Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. Dec 7. [Epub ahead of print]

Zucker S, Drews M, Conner C et al. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* 273: 1216–1222.

