

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
UNIVERSIDAD DE CHILE

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

“Triclosán inhibe la producción de Uroquinasa estimulada por TNF- α y H₂O₂ en fibroblastos gingivales humanos”

Rodrigo Esteban Arancibia Reyes

Director

Dr. Patricio Smith F.

Laboratorio de Biología Celular.
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)
Universidad de Chile
y Unidad de Odontología
Laboratorio de Fisiología Periodontal
Centro de Investigaciones Médicas (CIM)
Pontificia Universidad Católica de Chile

Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreund

Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2008

*Esta tesis fue financiada completamente por:
Proyecto Fondecyt #1061065*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Patricio Smith por sus enseñanzas, buenos momentos y dedicación que permitieron sacar este trabajo adelante. También me gustaría agradecer a mis compañeros de laboratorio, Mónica Cáceres, Nicolás Tobar y Javier Guerrero por todo el tiempo invertido en enseñarme y hacer mi estadía en el laboratorio de biología celular del INTA una experiencia invaluable y entretenida. Además quiero agradecer a Francisco Altamirano por su ayuda incondicional en los momentos difíciles de desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a mi familia, Cecilia, Roberto, Felipe, Ela, Tata, Lore, Luis y Marce por todo el cariño y constante preocupación durante todo el tiempo de desarrollo de este trabajo.

Por último quiero agradecer a Constanza Solar por ser mi principal apoyo y por todos los momentos inolvidables de estos años.

INDICE

INDICE	i
INDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCION	1
1.1 Enfermedad Periodontal	1
1.1.1 Patogénesis de la Enfermedad Periodontal	2
1.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno	3
1.1.3 Uroquinasa	3
1.1.4 Factor de Necrosis Tumoral α	5
1.1.4 Vías de Señalización Intracelulares Involucradas en la Enfermedad Periodontal	6
1.2 Triclosán	7
1.2.1 Usos y Aplicaciones	8
1.2.2 Mecanismo de Acción	9
1.3 Planteamiento del Problema	11
2. HIPOTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	13
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
5. MATERIALES Y METODOS	14
5.1 Instrumentos y Equipos	14
5.2 Cultivo Celular	14
5.3 Crio-Preservación	15
5.4 Análisis Semicuantitativo de la Expresión de RNAm mediante el Ensayo de Transcripción inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	16
5.5 Zimografía de Caseína y ensayo de Difusión Radial	18
5.6 Inmunofluorescencia	19
5.7 Detección de la Activación de MAPK a través de Western-Blot	20
5.8 Experimentos de transducción de señales	22
5.9 Detección de la producción de uPA a través de Western-Blot	23
5.10 Efecto de los ROS en la activación y producción de Upa	23
5.11 Determinación de la producción de H_2O_2 por TNF- α	24
5.12 Expresión de Resultados y Análisis Estadístico	25

6. RESULTADOS	26
6.1 Triclosán inhibe la actividad y expresión de uPA junto con la generación de plasmina activa estimuladas por TNF-α en fibroblastos gingivales humanos.	26
6.2 La ruta de NF-κB está involucrada en la producción de uPA estimulada por TNF-α, pero no es alterada por Triclosán.	31
6.3 La producción de uPA estimulada por TNF-α es dependiente de la actividad de la vía de señalización JNK.	34
6.4 Triclosán inhibe la activación de la vía de señalización JNK en fibroblastos gingivales.	35
6.5 La producción y actividad de uPA estimulada por TNF-α depende del estado redox intracelular la presencia de peróxido en el medio extracelular en fibroblastos gingivales humanos.	39
6.6 TNF-α induce la producción de H₂O₂ en FGH y Triclosán tiene la capacidad de inhibir esta producción.	44
6.7 H₂O₂ exógeno induce la actividad de uPA y Triclosán revierte este aumento.	47
6.8 La actividad de uPA estimulada por H₂O₂ es dependiente de la actividad de la vía de señalización de ERK y es inhibida por Triclosán.	49
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	60
9. BIBLIOGRAFIA	61
10. ANEXOS	67
10.1 Presentaciones a congresos/premios obtenidos.	67
10.2 Publicaciones.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de Triclosán.....	7
Figura 2: Cultivo primario de FGH teñidos con cristal violeta.....	15
Figura 3: Esquema de conversión de Diclorodihidrofluoresceína-diacetato.....	25
Figura 4: Triclosán inhibe la actividad de uPA estimulada por TNF- α en FGH.....	27
Figura 5: Triclosán inhibe la producción de uPA y la activación de plasmina estimuladas por TNF- α en FGH.....	29
Figura 6: Triclosán inhibe la expresión del RNAm de uPA estimulada por TNF- α	30
Figura 7: NF- κ B está implicado en la producción de uPA estimulada por TNF- α pero no es afectado por Triclosán.....	33
Figura 8: La inhibición de la ruta JNK interfiere en la producción de uPA estimulada por TNF- α	35
Figura 9: Triclosán altera la fosforilación de JNK estimulada por TNF- α	37
Figura 10: Triclosán inhibe la producción de c-Jun estimulada por TNF- α	38
Figura 11: NAC inhibe la actividad de uPA estimulada por TNF- α	40
Figura 12: NAC inhibe la expresión de uPA estimulada por TNF- α	41
Figura 13: DPI inhibe la activación de uPA estimulada por TNF- α	42
Figura 14: Catalasa inhibe la activación de uPA estimulada por TNF- α	44
Figura 15: Triclosán inhibe la producción de H ₂ O ₂ estimulada con TNF- α	46
Figura 16: Efecto de Triclosán, NAD(P)H oxidasa, JNK y NAC en la producción de H ₂ O ₂ estimulada con TNF- α	47
Figura 17: Triclosán inhibe la actividad y expresión de uPA estimulada por H ₂ O ₂ exógeno.....	49
Figura 18: La actividad de uPA estimulada por H ₂ O ₂ exógeno es dependiente de la vía ERK-1/2.....	50
Figura 19: Triclosán inhibe la fosforilación de ERK-1/2 estimulada por H ₂ O ₂ exógeno.....	52
Figura 20: Modelo propuesto para la acción de Triclosán en FGH.....	57

ABREVIATURAS

c-DNA:	ADN complementario.
DCFH-DA	2,7-Dicloro-dihidro-fluorecein-diacetato
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
DNA:	Acido desoxirribonucleico.
DPI:	Difeniliodinium
EDTA:	Etilendiamintetraacetato (ácido etilendiamino tetracético).
ERK1/2:	Proteínas quinasas reguladas extracelularmente 1 y 2
FGH:	Fibroblastos gingivales humanos
GAPDH:	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.
H₂O₂:	Peróxido de Hidrógeno
JNK:	Quinasa N-terminal de c-Jun.
NAC:	N-acetil-L-Cisteína
NEM:	N-etilmaleimida.
NFκB:	Factor Nuclear kappa B
MEC:	Matriz extracelular.
MEK1/2:	MAP quinasa quinasa 1 y 2
PAI-1:	Inhibidor de activador del plasminógeno tipo uroquinasa .
Pb:	Pares de bases.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF:	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

RT-PCR:	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RNA:	Acido ribonucleico
RNAm:	ARN mensajero.
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
t-BOOH:	Ter-Butil peróxido
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa
uPA:	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

RESUMEN

Triclosán inhibe la producción de Uroquinasa estimulada por TNF- α y H₂O₂ en fibroblastos gingivales humanos

Triclosán es un agente antibacteriano ampliamente utilizado en productos cosméticos y de higiene oral (jabones, desodorantes, dentífricos, colutorios, etc.) como agente desinfectante. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que este fármaco podría tener un papel en el control de la inflamación y retrasar el avance de la enfermedad periodontal.

La inflamación crónica en esta patología y la destrucción de los tejidos periodontales, pueden estar asociadas a la elevada activación de plasminógeno a plasmina mediada por Uroquinasa (uPA), una serin-proteasa altamente expresada en esta enfermedad, involucrada en la remodelación tisular y activación de diversas otras proteasas que participan en la degradación de la matriz extracelular (MEC). Por otra parte, en la enfermedad periodontal se encuentra una mayor presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), niveles elevados de metaloproteasas y citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lo que en conjunto con los demás factores, contribuyen a la destrucción de la MEC.

En el presente estudio se estudió la capacidad de Triclosán para interferir la actividad y producción de uPA y ROS en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos (FGH) estimulados con TNF- α y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), además de determinar la relación entre la actividad y expresión de uPA con la inducción de vías de señalización intracelulares NF κ B, JNK y MEK/ERK1/2, la activación de plasminógeno, el estado redox intracelular y la modulación de estas por Triclosán.

Las células fueron estimuladas con TNF- α y Terbutil Peróxido (t-BOOH) un análogo orgánico de H₂O₂ de mayor estabilidad y con capacidad de penetrar membranas celulares.

Se utilizaron distintos inhibidores específicos para las diferentes rutas; de la actividad de MAPquinasas se utilizó PD98095, inhibidor selectivo de MEK1 y SP600125, inhibidor selectivo de JNK. Para inhibir la activación de la vía NF- κ B se ocupó el péptido SN50 y su péptido control SN50M. Además de utilizó el inhibidor de la enzima productora del radical superóxido NADH/NAD(P)H oxidasa (DPI), el antioxidante intracelular y precursor de glutatión (NAC), la enzima convertidora de H₂O₂ catalasa y por último Triclosán, con el fin de interferir la actividad y producción de uPA. Esta fue analizada por zimografía y Western-blot respectivamente. La expresión del ARNm de uPA fue evaluada a través de RT-PCR. La activación de las vías de señalización intracelulares JNK y ERK-1/2 fueron analizadas por Western-blot. La activación de NF- κ B fue analizada por inmunofluorescencia. Se evaluó la producción intracelular de ROS utilizando el fluoróforo DCHF-DA.

Se comprobó que TNF- α es un fuerte estímulo para la producción y actividad de uPA. Triclosán disminuyó la actividad de esta (de forma dosis dependiente) y su expresión (ARNm y proteína), además de inhibir la conversión de plasminógeno a plasmina estimuladas por TNF- α . Se observó también que la actividad de uPA estimulada con esta citoquina es dependiente de las rutas de señalización asociadas a NF- κ B y JNK. TNF- α indujo la fosforilación de JNK y producción del factor de transcripción río debajo de JNK c-Jun, las cuales fueron inhibidas por Triclosán, sin embargo no se observaron cambios en la activación de la vía NF- κ B. Además, NAC, DPI y catalasa inhibieron la actividad y producción de uPA estimulada por TNF- α . El pro-oxidante t-BOOH indujo la actividad y producción de uPA de forma dosis dependiente y activó la vía ERK-1/2. Triclosán y el inhibidor de ERK-1/2 PD98059 inhibieron la producción y activación de uPA estimuladas con t-BOOH. Se observó que Triclosán posee la capacidad de inhibir la activación de la vía ERK-1/2 estimulada por t-

BOOH, además de reducir los niveles de ROS intracelulares estimulados con TNF- α , de forma similar que NAC y DPI.

Estos resultados sugieren que Triclosán puede tener un efecto protector en la enfermedad periodontal al disminuir la inflamación y destrucción tisular asociados a la actividad de uPA y producción de ROS con la consiguiente remodelación del tejido conectivo gingival. Se sugiere entonces que Triclosán posee una actividad antioxidante intracelular no descrita antes en la literatura, lo que junto con lo anterior podría explicar en parte su efecto protector previamente reportado en estudios clínicos, y sugiere que estos pueden ser aspectos adicionales de su efecto clínico en la destrucción periodontal.

ABSTRACT

Triclosan inhibits urokinase type plasminogen activator stimulated by TNF- α and H₂O₂ in human gingival fibroblasts

Triclosan is an antimicrobial agent highly used in cosmetic and hygiene products (soaps, deodorants, toothpastes, mouth-washes, etc). Recent studies have suggested that Triclosan could have an important role in controlling inflammation and retarding periodontal disease.

Chronic inflammation occurring in this pathology and periodontal tissue destruction, can be associated with an elevated plasminogen activation mediated by urokinase (uPA), a serine-protease highly expressed in this pathology involved in tissue remodeling and activation of diverse extracellular matrix metalloproteinases (MMPs). On the other hand, there is an elevated concentration of reactive oxygen species (ROS) and proinflammatory cytokines like tumor necrotic factor alpha (TNF- α) that contribute to periodontal tissue and extracellular matrix (ECM) destruction.

In the present study we evaluated if Triclosan's capacity interferes with the activation and expression of uPA and ROS in primary cultures of human gingival fibroblasts (HGF) stimulated with TNF- α and hydrogen peroxide (H₂O₂). The activity and expression of uPA were determined, the relation with intracellular transduction pathways NF κ B, JNK and MEK/ERK1/2, plasminogen activation, intracellular redox status and the modulation of these by Triclosan were explored.

HGF were stimulated with TNF- α and Tertbutyl Peroxide (1,1-Dimethylethyl hydroperoxide, t-BOOH), an organic analogue of H₂O₂ that is very stable and crosses

cellular membranes. Different kinds of specific inhibitors were used: MAPK activity (Mek1 inhibitor PD98095 and JNK inhibitor SP600125), NF- κ B inhibitor (SN50), superoxide producing enzyme NADH/NAD(P)H inhibitor (DPI), glutathion precursor and intracellular antioxidant (NAC), H₂O₂ converting enzyme (Catalase) and Triclosan in order to interfere with uPA's activity and expression. These were analyzed through casein zymography and Western-blot, respectively. Expression of uPA was analyzed using RT-PCR. Activation of the signal transduction pathways JNK and ERK-1/2 was analyzed with Western-blot, and NF- κ B activation through immunofluorescence. ROS production was evaluated utilizing the fluorophore DCHF-DA.

We proved that TNF- α is a strong stimuli for uPA activity and production and that Triclosan inhibits this response in a dosis-dependant manner. Triclosan also inhibited uPA's RNA expression and diminished plasminogen activation to plasmin stimulated with TNF- α . It was also observed that uPA's stimulation is dependent on the activation of NF- κ B and JNK transduction pathways. TNF- α induced JNK's phosphorylation and c-JUN transcription factor, and both were inhibited by Triclosan. There was no change on NF- κ B activation. Moreover, NAC, DPI and catalase inhibited uPA's activation and production stimulated by TNF- α .

Pro-oxidant t-BOOH induced uPA's activation and expression in a dose dependant manner and activated ERK-1/2 signal transduction pathway. Triclosan and PD98059 inhibited t-BOOH stimulated uPA activation and production. Triclosan inhibited t-BOOH stimulated ERK-1/2 activation and reduced intracellular ROS levels stimulated by TNF- α , in a similar way to NAC and DPI.

These results suggest that Triclosan can have a protector effect on periodontal disease by inhibiting inflammation and tissular destruction associated with uPA activity and ROS production with connective tissue associated remodeling.

We suggest that Triclosan possesses a novel intracellular antioxidant activity that could explain in part its protective effect previously reported in clinical studies and suggests that this could be an additional aspect of its clinical effect on periodontal tissue destruction.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad Periodontal.

El cuidado de la salud bucal se ha constituido en un problema de Salud Pública que demanda un gran esfuerzo y crecientes recursos económicos. Tanto caries como enfermedades periodontales son las formas más prevalentes de enfermedades bucales y a las que se les ha dedicado mayor esfuerzo tanto en el área de la prevención, tratamiento oportuno e investigación¹. La gingivitis corresponde a una lesión inflamatoria de la encía que es desencadenada luego de la colonización de este tejido por bacterias². Esta lesión puede evolucionar hacia un cuadro de mayor severidad conocido como Enfermedad Periodontal (EP) o periodontitis marginal, lo que puede derivar en la destrucción progresiva irreversible de los tejidos de soporte dentario y eventualmente a la pérdida de las piezas dentarias². La EP genera un alto impacto en la salud bucal de la población. Datos nacionales permiten afirmar que en la población de 35 a 44 años de edad, un 90% de los individuos requiere tratamiento periodontal, porcentaje que sube a un 100% en el grupo de 65 a 74 años³. Se ha postulado recientemente que esta patología inflamatoria de origen infeccioso puede tener efectos sistémicos, siendo vinculada a eventos cardiovasculares, complicaciones en el embarazo tan graves como parto prematuro y también diabetes mellitus, entre otras⁴. Por ello, su prevención, diagnóstico precoz y tratamiento son objetivos sanitarios importantes que demandan una inversión significativa de recursos tanto a nivel nacional como internacional⁵.

1.1.1 Patogénesis de la Enfermedad Periodontal

El modelo actual de etiopatogénesis de la enfermedad periodontal establece que bacterias periodontopáticas como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* son agentes causales primarios⁶. Su introducción como infección exógena junto con una microbiota patogénica dispara una cascada de respuestas en el hospedero. Una respuesta inmediata es el reclutamiento y migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) al sitio de la infección periodontal. Si estas células inflamatorias son capaces de contener y eliminar los patógenos causales y sus productos (como LPS (lipopolisacárido) de bacterias Gram negativas) vía fagocitosis y mecanismos de eliminación intracelular, la enfermedad puede limitarse a gingivitis. Si estos mecanismos fallan, y los patógenos o sus productos penetran los tejidos del hospedero, la enfermedad puede convertirse en periodontitis, siendo factores genéticos y ambientales determinantes en este proceso⁷.

Además del rol de las bacterias en la patogénesis de la enfermedad periodontal, una etapa clave en la periodontitis progresiva es la degradación de las moléculas del tejido conectivo involucradas en la inserción periodontal⁸. Para el mantenimiento de los tejidos periodontales existe un delicado balance entre salud y enfermedad, así como también entre los procesos de reparación y regeneración de tejido nuevo. Durante la enfermedad periodontal, los procesos de destrucción tisular exceden los procesos de síntesis tisular. El colágeno es la proteína estructural más abundante del periodonto, siendo el colágeno tipo I predominante en el tejido

conectivo gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar⁹. En ciertas condiciones como la enfermedad periodontal, se afecta el balance entre la síntesis y la degradación; incluso durante la gingivitis, muchas de las fibras colágenas se rompen para dar espacio al infiltrado de células inflamatorias del hospedero. Esta degradación del colágeno, y la destrucción del periodonto ocurre mediante la digestión extracelular vía metaloproteasas de matriz (MMPs)¹⁰, las cuales son expresadas en una amplia variedad *in vivo*, como también en células aisladas de tejidos conectivos sanos y enfermos¹¹.

1.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno

Los mecanismos asociados al surgimiento y desarrollo de la Enfermedad Periodontal están además muy relacionados con la sobre-activación de leucocitos PMN, lo que conlleva a una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), tanto de parte de este tipo celular como también de los fibroblastos^{12,13}, y que incluyen a los tres productos sucesivos de la reducción del oxígeno molecular tales como el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), con la consecuente ruptura del balance redox y también la disminución de la capacidad antioxidante tisular e intracelular¹⁴.

1.1.3 Uroquinasa

Los fibroblastos son el tipo celular predominante en los tejidos conectivos gingivales, y están activamente involucrados en la formación y destrucción de los tejidos conectivos tanto en salud como enfermedad¹⁵. La matriz extracelular (MEC)

es activamente degradada por diversos grupos de enzimas que incluyen a la serin-proteasa de 52 kDa uroquinasa, también conocida como el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA)¹⁶.

uPA participa en los procesos proteolíticos del remodelamiento tisular, migración celular, angiogénesis, invasión tumoral y metástasis. uPA es secretada por las células como un precursor inactivo, pro-uPA, el cual se une a su receptor (uPAR) en la superficie celular. La unión posterior de plasmina a este complejo, junto con el procesamiento enzimático de pro-uPA en el residuo de lisina 158 produce un heterodímero activo. El principal sustrato fisiológico de uPA es el precursor inactivo de plasmina, plasminógeno, el zimógeno de proteasa más abundante en el organismo. uPA es capaz de convertir rápidamente al plasminógeno en plasmina enzimáticamente activa, otra serin-proteasa directamente relacionada con la degradación de la MEC, responsable de la degradación de fibrina y la conversión de MMPs desde un estado latente, a su forma activa¹⁶, lo que a su vez conlleva a la degradación de otras moléculas propias de la MEC¹⁷.

La producción de uPA está sujeta a una activa regulación, y su expresión puede ser inducida por factores de crecimiento y citoquinas^{16,18}.

Existen dos inhibidores de los activadores de plasminógeno llamados PAI-1 y PAI-2 que regulan la actividad enzimática de uPA. Estos se pueden unir a la cadena catalíticamente activa de uPA. Cuando uPA activa está unida a su receptor, la unión posterior de PAI-1 resulta en la internalización y degradación del complejo uPA:PAI-1:uPAR¹⁹.

1.1.4 Factor de Necrosis Tumoral alfa

TNF- α es una de las citoquinas clave implicadas en la respuesta inflamatoria, y ha sido encontrada en una alta proporción en el fluido gingival crevicular y tejidos periodontales enfermos^{20,21}.

TNF- α es una citoquina proinflamatoria e inmunomoduladora producida por un amplio espectro de células como monocitos, macrófagos, linfocitos B y T y células NK, así como también por células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos y queratinocitos. Su incremento ha sido detectado en sitios periodontales afectados por enfermedad periodontal y está asociado a la destrucción y reabsorción ósea²². En la enfermedad periodontal, TNF- α induce el reclutamiento de leucocitos circulantes y estimula la producción de otros mediadores²³, como prostaglandinas, IL-1, IL-6, MMPs y factor activador de plaquetas, amplificando o manteniendo la respuesta inflamatoria. De esta manera, la capacidad reparativa del periodonto se reduce, dando como resultado un balance negativo con destrucción tisular²⁴⁻²⁶.

Se sabe que TNF- α , junto con otras citoquinas proinflamatorias, inducen la producción de ROS en diversos tipos celulares²⁷. Se desconoce si esto ocurre en FGH. Además, se sabe que TNF- α induce la expresión de la enzima superóxido dismutasa mediada por ROS²⁸ lo que podría indicar la posible participación en la regulación del balance redox tisular e intracelular.

1.1.5 Vías de señalización intracelulares involucradas en la Enfermedad Periodontal.

Existen diversos agentes, tanto endógenos como exógenos, que pueden inducir la aparición y progresión de la Enfermedad Periodontal, implicando a un gran número de vías de señalización intracelulares. Por esta razón es importante identificar vías comunes de transducción de señales para buscar alternativas terapéuticas, y por ende resulta ser una tarea fundamental entender las redes de señalización que regulan la degradación del tejido periodontal, la inflamación y los eventos reparativos del periodonto.

Está demostrado que TNF- α puede inducir la síntesis de uPA en otros modelos celulares²⁹, sin embargo el mecanismo de transducción de señales que se activa en cada modelo celular puede ser diferente. Se ha detectado la participación del factor de transcripción NF κ B²³, así como también la ruta de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *mitogen activated protein kinases*), que consiste en una serie de quinasas, que se activan en forma secuencial para regular la expresión génica y la síntesis de proteínas³⁰. Existen 3 subfamilias de MAPK: proteínas quinasas reguladas extracelularmente (ERK1/2), proteínas quinasas activadas por estrés (JNKs, *c-Jun N-terminal kinases*) y las proteínas quinasas p38. Las MAPK se estructuran como cascadas de proteínas, en donde una quinasa inicial o MAP quinasa quinasa quinasa (MEKKK) fosforila y activa a una MAP quinasa quinasa (MEKK), la que finalmente activa a una MAPK (ERK, JNK o p38) que regula los diferentes procesos celulares³¹. Se desconoce si en este modelo celular el receptor de TNF activa todas o alguna de estas rutas y además, si están o no

relacionadas con la activación de uPA. Sin embargo, la ruta de p38 sería la menos importante en la activación de uPA estimulada por otro factor en este modelo celular¹⁶. Es por todos estos antecedentes previos, que la producción de uPA estimulada por TNF- α , puede ser considerada como un mecanismo fundamental e importante involucrado en la destrucción de los tejidos conectivos periodontales actuando como un eje crítico de regulación en la remodelación tisular.

1.2 Triclosán

Triclosán es un compuesto clorado orgánico, no-iónico y liposoluble, de aspecto blanco e inodoro el cual posee grupos funcionales representativos tanto de éter como de fenol. El nombre químico de Triclosán es 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter y su fórmula molecular es $C_{12}H_7O_2Cl_3$ (Fig. 1). Triclosán fue originalmente desarrollado por la compañía Ciba-Geigy, Basel, Suiza bajo el nombre original de “Irgasan” en la década de los sesentas.

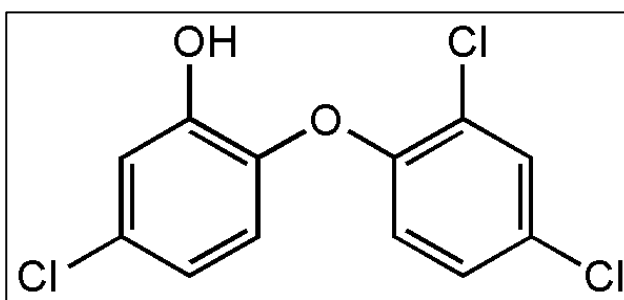


Figura 1. Estructura química de Triclosán.

1.2.1 Usos y aplicaciones

Este derivado fenólico es ampliamente utilizado en muchos productos cosméticos y de higiene como jabones (0,15-0,30%), desodorantes, cremas de afeitar, geles de ducha y suturas quirúrgicas como agente desinfectante. El uso efectivo de Triclosán ha sido directamente atribuido por décadas a su capacidad antibacteriana inmediata, persistente y de amplio espectro³². Se ha demostrado que Triclosán es efectivo en reducir y controlar la contaminación por bacterias en manos y productos tratados. Triclosán posee una amplia efectividad contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y algunos hongos^{33,34}. Su espectro incluye a *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, algunos *staphylococos*, *streptococos* y *mycobacterias*, además de *Escherichia coli* y *Proteus spp* entre otros³⁵⁻³⁸. Recientemente, se ha recomendado el régimen de aseo completo con Triclosán (0,3%-2%) en pacientes cuya piel acarrea la cepa resistente a Meticilina de *Staphylococcus aureus*³⁹, siguiendo el exitoso control de apariciones de este patógeno en diversas clínicas^{40,41}.

La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de EEUU reconoce a Triclosán como una droga de uso de Venta Libre (Over-the-Counter Drugs u OTC) o de prescripción dependiendo de la formulación y aplicación que se le utilice⁴²⁻⁴⁴. Además, la FDA aprueba el uso de Triclosán como OTC en productos de higiene bucal en concentraciones similares a las encontradas en productos de uso tópico⁴⁵. Es especialmente utilizado en la industria del cuidado oral incorporándolo en dentífricos y colutorios bucales⁴² de diversas marcas por su actividad bacteriostática a bajas concentraciones y bactericida a concentraciones más altas.

1.2.2 Mecanismo de acción

Los primeros estudios sugirieron a la membrana citoplasmática bacteriana interna como el principal blanco de acción bactericida de Triclosán⁴⁶. Sin embargo, posteriormente fue demostrado en *E. coli* y *S. aureus* que a concentraciones menores, la actividad bacteriostática de este resulta del bloqueo de la síntesis de lípidos al inhibir específicamente a una flavoenzima crítica de la ruta, denominada enoil-acil-carrier-protein-reductasa, enoil-ACP-reductasa o Fab1^{47,48}. Esto se debe a la formación de un complejo entre Triclosán, la enzima y su cofactor NAD⁺, bloqueando el sitio activo de la enzima, lo que conlleva a la disrupción y desestabilización de la membrana bacteriana⁴⁹.

En cuanto a su papel en los tejidos periodontales, inicialmente fue descrito que este agente farmacológico poseía un efecto directo en la reducción de la placa bacteriana y esta propiedad fue asociada con una reducción significativa en la inflamación gingival⁵⁰⁻⁵⁵. Sin embargo, estudios más recientes demostraron que Triclosán puede también ejercer un efecto antiinflamatorio. Estudios clínicos han reportado que Triclosán puede retardar la progresión de la enfermedad periodontal al ser utilizado en dentífricos⁵⁶. Esta propiedad terapéutica ha sido explicada en parte por la habilidad de Triclosán para inducir cambios cuantitativos y cualitativos en la microflora subgingival en pacientes con periodontitis⁵⁷ y potencialmente en la modulación de la respuesta inflamatoria periodontal⁵⁸⁻⁵⁹. Otros estudios han reportado que Triclosán puede también promover la cicatrización de los tejidos periodontales cuando este agente es utilizado en asociación con la eliminación mecanizada de placa bacteriana⁶⁰.

Estudios experimentales en perros han indicado que Triclosán, debido a su favorable coeficiente de partición, penetra el tejido gingival y pasa al torrente circulatorio después de la aplicación tópica de un colutorio que contiene Triclosán al 0,03%⁶¹. Además, se ha demostrado que alrededor de un 2-4% de una dosis diaria de Triclosán (9,0 mg) es absorbido y circulado en el torrente sanguíneo⁶². Adicionalmente se sabe que Triclosán es rápidamente absorbido y eliminado del cuerpo humano, y que los niveles plasmáticos de este son retornados a niveles basales al cabo de 72 horas después de una dosis única (1,25 g) de un dentífrico que posee Triclosán al 0,03%⁶³. Finalmente, se ha demostrado que Triclosán (1µg/mL) marcado con ¹⁴C es absorbido por los fibroblastos gingivales humanos (FGH), acumulándose en el citoplasma y translocado al núcleo al cabo de una hora, encontrándose en estos compartimientos incluso después de reiterados lavados, observándose una cinética de incorporación similar a la de andrógenos liposolubles en FGH⁶⁴.

Se ha reportado que la aplicación local de Triclosán puede inhibir la inflamación de la mucosa oral y reducir las reacciones inflamatorias químicamente inducidas en piel humana^{65,66}. Triclosán puede inhibir la formación de prostaglandina E-2 (PGE2) e I-2 en FGH estimulados con el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o interleuquina-1 β (IL-1 β)^{67,68}. Las prostaglandinas se asocian con destrucción tisular, cambios metabólicos en el fibroblasto y reabsorción ósea. Se han encontrado que los niveles altos de PGE2 en el fluido gingival crevicular se correlacionan positivamente con inflamación periodontal y destrucción tisular⁶⁹. El efecto inhibitorio de Triclosán

en este aspecto ha sido explicado en parte por el mecanismo que posee este agente de disminuir la expresión de Prostaglandina-E-sintasa microsomal en fibroblastos gingivales⁷⁰, e inhibir la vía de la lipo-oxigenasa y ciclo-oxigenasa^{71,72}.

Finalmente, se ha reportado que Triclosán reduce la producción de las citoquinas IL-1 β e Interferon- γ , además de disminuir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en FGH^{73,74}. Sin embargo, el efecto de Triclosán sobre las vías de señalización intracelulares involucradas en la producción de mediadores inflamatorios en FGH no ha sido hasta ahora estudiado.

1.3 Planteamiento del problema

Debido a que la remodelación tisular juega un papel crítico en la enfermedad periodontal, y uPA posee un papel protagónico en este proceso, se propone que Triclosán podría estar actuando mediante mecanismos diferentes al bactericida y antiinflamatorio ya reportados, afectando adicionalmente a los responsables de la remodelación tisular. Se desconoce entonces si Triclosán posee un efecto sobre la remodelación de tejidos conectivos gingivales mediada por uPA. Debido a esto, en el presente estudio, hemos analizado la habilidad que posee Triclosán de regular la producción de uPA en FGH estimulados con TNF- α . Además, hemos estudiado

algunas de las vías de transducción de señales involucradas en la producción de uPA que podrían ser moduladas por Triclosán.

Se sabe, por otro lado, que la producción de uPA puede ser estimulada por ROS⁷⁵. Triclosán podría estar participando adicionalmente, en la modulación de los niveles de ROS intracelulares, y esto podría afectar directamente en la producción de uPA. Debido a que en el tejido gingival inflamado puede existir un balance redox alterado^{76,77}, el efecto de H₂O₂ exógeno podría también afectar la actividad y producción de uPA y Triclosán podría modular esta respuesta, interfiriendo con alguna de las vías de transducción de señales activadas por H₂O₂.

Debido a todos estos antecedentes se plantearon las siguientes interrogantes: ¿TNF- α y/o H₂O₂ activan y/o inducen la expresión de uPA en FGH? ¿Cuáles son las vías de señalización intracelulares involucradas en estos procesos? ¿Cuál es el papel de Triclosán en la regulación de la activación/expresión de uPA y producción de ROS en FGH?

2. HIPÓTESIS

Por los antecedentes presentados se postula la siguiente hipótesis:

“En fibroblastos gingivales humanos, Triclosán inhibe la producción de uPA estimulada por TNF- α y H₂O₂ a través de la modulación de las vías de transducción de señales NF κ β , ERK-1/2 y/o JNK. “

3. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es estudiar si Triclosán modula la actividad/producción de uPA, evaluando el papel de los ROS y las vías de señalización asociadas, estimulada por TNF- α y H₂O₂ en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Determinar si TNF- α induce la activación, expresión y producción de uPA, además de la conversión de plasminógeno a plasmina activa, y si estas son inhibidas por Triclosán en FGH.
- 2.** Caracterizar las vías de transducción de señales (NF κ B, JNK/c-Jun y ERK) involucradas en la producción de uPA por TNF- α en FGH y determinar si Triclosán inhibe alguna de estas rutas de señalización.
- 3.** Estudiar si la activación y producción de uPA dependen del estado redox intracelular, la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la presencia de H₂O₂ extracelular en FGH.
- 4.** Evaluar si TNF- α y H₂O₂ inducen la producción intracelular de ROS en FGH y si esta es inhibida por Triclosán.
- 5.** Determinar si H₂O₂ exógeno induce la actividad y producción de uPA, y si estas son inhibidas por Triclosán en FGH.
- 6.** Caracterizar las vías de transducción de señales involucradas en la producción de uPA por H₂O₂ y si Triclosán las inhibe en FGH.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Instrumentos y equipos.

Los instrumentos y equipos utilizados son: Campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129; Incubador Lab-Line CO₂ automático; Cámaras de corrida y transferencia Bio-Rad Mini Protean III, Centrífuga Biofuge prime R Heraeus; Microscopio invertido de contraste de fase Nikon modelo TMS-F, Fluorómetro Spectra MAX Gemini EM, Molecular Devices; Termociclador TECHNE, TC-312.

5.2 Cultivo Celular.

Los protocolos de obtención de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos utilizados en este estudio fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los cultivos primarios de FGH fueron obtenidos por el método del explante⁷⁸, procedimiento que permite obtener células confluentes en cultivo a partir de tres semanas aproximadamente después de realizado el procedimiento, donde se espera que los fibroblastos migren fuera de los explantes disgregados mecánicamente hacia la placa de cultivos en medio enriquecido. Se obtuvieron los explantes de tejido gingival a partir de tejido retromolar de pacientes mujeres y hombres en tratamiento con un procedimiento de extracción de terceros molares en una clínica privada en Santiago, Chile. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes antes de realizar la biopsia. Este tejido normalmente es eliminado durante la extracción de terceros molares y no representa por lo tanto un daño significativo para el paciente. No existían reportes de

historial previo de inflamación del tejido retromolar en estos pacientes. Además, estos pacientes no tenían un historial médico o farmacológico pre-existente relevante durante los seis meses anteriores al procedimiento. La población de células resultantes fue cultivada en medio esencial mínimo alfa (α -MEM), el cual contenía suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 μ g/ml de penicillina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU.), 100 μ g/mL de estreptomina (Sigma) y 50 μ g/ml de gentamicina (Sigma) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Todos los experimentos fueron realizados entre el cuarto y décimo sub-cultivo.

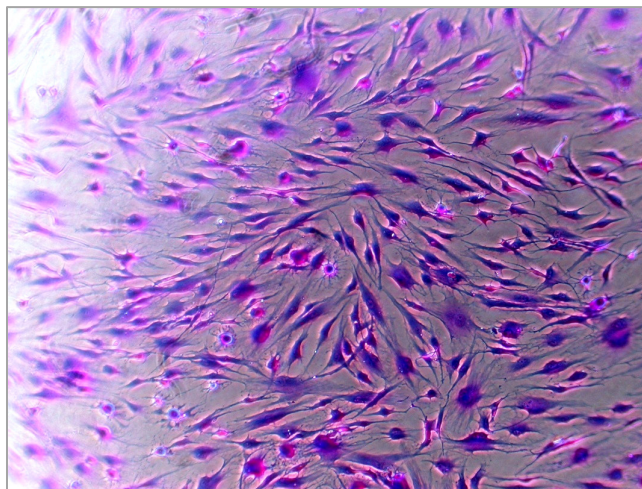


Figura 2. Cultivo primario de FGH teñidos con cristal violeta

Las células fueron fijadas en metanol frío por 10 minutos y luego teñidas con una solución de Cristal Violeta 0,5% en metanol al 20%. Luego fueron lavadas con agua destilada y fotografiadas (Aumento 20X).

5.3 Crio-preservación de FGH.

Las células se liberaron de la placa con tripsina-EDTA (Gibco, BRL, Grand Island, NY, EEUU), a la cual se agregó 4 volúmenes del medio de cultivo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1800 rpm. El sedimento resultante se resuspendió

en una mezcla de criopreservación (SFB 90% y DMSO 10%) a una densidad de 1×10^6 células/mL. Se distribuyó 1 mL de la solución en criotubos rotulados y se congelaron mediante el descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar -196 °C. Las células criopreservadas se almacenaron sumergidas en N_2 líquido.

5.4 Análisis semicuantitativo de la expresión de RNAm mediante el ensayo de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se sembraron FGH en placas de 60 mm a una densidad de 5×10^5 por placa. Al cabo del tratamiento indicado se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) y se sometieron a la extracción de RNAm utilizando el reactivo Trizol (Gibco) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, detalladas brevemente a continuación. A cada placa de cultivo se agregó 1 mL de Trizol y se dejó actuar por 5 minutos a temperatura ambiente, para luego homogeneizar mediante el paso reiterado del lisado por la punta de una micropipeta de 1000 μ L. Luego se recogió el lisado y se transfirió a un tubo de 1,5 mL. Se adicionó 0,2 ml de cloroformo por mL de Trizol, agitándose suavemente durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos, luego de esto se centrifugaron las mezclas a 10.000 rpm (microcentrífuga) durante 5 minutos a temperatura ambiente, separando la mezcla en una fase acuosa que contiene el RNA total (transparente) y una fase orgánica (roja). La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 0,5 ml de alcohol isopropílico, se agitó en un vortex durante 10 segundos y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, luego se sometió la mezcla a centrifugación durante 5 min, a 10.000 rpm. Se eliminó

el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Luego de una nueva centrifugación se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizó un tratamiento con DNAsa RQ1 libre de RNAsas (Promega, Madison, WI, EEUU) para eliminar el posible DNA genómico residual contaminante. Se dejó actuar por 30 minutos y luego se detuvo la reacción mediante temperatura a 70 °C por 10 minutos. 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 a 260 y 280 nm.

Una vez conocida 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 nucleasa 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 minutos. Posteriormente se agregó 5 µL de tampón de enzima 5x, 1,5 µL de dNTP 10 mM, 0,8 µL de transcriptasa inversa 200 U/µL y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µL de volumen de reacción. Finalmente se realizó la síntesis de cDNA a 42 °C durante una hora. Una vez obtenido el cDNA de cada muestra, se hizo una dilución 1/100 (en agua libre de nucleasas) y se leyó en un espectrofotómetro para conocer la concentración de cDNA obtenida en cada muestra. El cDNA se almacenó a -20°C.

Los análisis de RT-PCR fueron llevados a cabo como descrito anteriormente²⁹. Brevemente: Una vez sintetizado los ADN complementarios respectivos, se sometieron a análisis por PCR, para los genes de estudio, utilizando el reactivo GoTaq Green Master Mix (Promega). La mezcla de reacción para PCR se preparó de la siguiente forma: En tubos de PCR de 0,2 mL, se agregaron 0,5 µL de dNTP 10mM, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL de solución tampón de PCR 10X, 0,5 µL de Taq 5 U/µL, 0,2 µg de cDNA, 0,5 µL de cada primer 10 pmol/µL y agua libre de nucleasa en cantidad suficiente para completar 25 µL de reacción.

Las secuencias de los partidores utilizados fueron las siguientes:

uPA forward 5' GCA GGA ACC CAG ACA ACC G 3' / uPA reverse 5' GAC CCA GGT AGA CGA TGT AG 3' (producto de PCR amplificado de 357 pb).

GAPDH forward 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' / GAPDH reverse 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3' (producto de PCR amplificado de 452 pb). En todos los casos la temperatura de apareamiento fue de 58°C. Los productos de PCR fueron sujetos a electroforesis en un gel de 1,5% de agarosa (Gibco) y el ADN fue visualizado mediante tinción con bromuro de etidio (Sigma).

5.5 Zimografía de Caseína y ensayo de difusión radial.

La actividad de uPA secretada en cultivos celulares fue determinada mediante zimografía caseinolítica⁷⁹. Alícuotas de medio condicionado durante 48 horas libre de SFB, normalizados por contenido de proteína medidos en el lisado celular, fueron sujetos a electroforesis en geles al 10% de SDS-policacrilamida (BioRad, Hercules,

CA, EEUU) en condiciones no desnaturalantes, y corridos a 4° en cubetas con hielo. Se extrajo el SDS de los geles mediante lavados exhaustivos con Triton X-100 (Sigma) al 2,5%. Luego, los geles fueron dispuestos sobre un segundo gel, de aspecto blanquecino, de agarosa al 1% conteniendo caseína (Sigma) al 0,5% y 1 µg/mL de plasminógeno (Sigma), e incubados a 37°C por 12 horas. La reacción se detuvo mediante CuSO₄ al 5%.

Debido a que caseína es sustrato para plasmina, la proteólisis dependiente de esta fue detectada como un área clara de degradación de caseína en un fondo blanco-azul. La cuantificación de estas bandas fue realizada mediante análisis densitométrico utilizando el software KODAK Molecular Imaging Software, version 4.0 (MI 4.0).

Los ensayos de difusión radial, para estudiar la activación de plasminógeno, fueron llevados a cabo en geles de agarosa al 1% conteniendo caseína al 0,5% y 2 mg/mL de plasminógeno. Alícuotas de medio condicionado, normalizadas por número de células fueron dispuestas en agujeros de igual tamaño previamente realizados, e incubadas a 37°C durante 16 horas. Como control se utilizaron geles que no contenían plasminógeno. Se midieron los diámetros de las zonas radiales de lisis de caseína y se analizaron por densitometría⁷⁹.

5.6 Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio. Después del estímulo apropiado, las células fueron lavadas una vez con tampón fosfato salino (PBS) y

luego fijadas con paraformaldehído (Sigma) al 4% durante 10 minutos, permeabilizadas con Triton X-100 0,25% por 5 minutos e incubadas con albúmina de suero bovino (BSA, Rockland, Gilbertsville, PA, EEUU) al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos primarios diluidos en PBS con BSA al 1% con una dilución 1/100 para anti-p65 (SantaCruz Biotechnology, CA, EEUU) e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron los complejos antígeno-anticuerpo con PBS e incubados con anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína-isotiocianato (Rockland). Las imágenes fluorescentes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Dresden, Alemania) y fotografiadas utilizando una cámara digital (Carl Zeiss) apropiadamente dispuesta.

5.7 Detección de la activación de MAPK a través de Western-blot.

Se estimularon los FGH con TNF- α (R&D systems, Minneapolis, MN, EEUU) y 50 μ M del análogo orgánico del peróxido de hidrógeno ter-butil Peróxido (t-BOOH, 1,1-dimetiletil hidroperóxido, Sigma) a distintos tiempos en medio de cultivo libre de SFB. En experimentos seleccionados se añadió Triclosán (Calbiochem, San Diego, CA, EEUU) 60 minutos antes de la estimulación con TNF- α o t-BOOH. Es importante mencionar que se evaluó el posible efecto citotóxico tanto de Triclosán, como de todos los inhibidores utilizados en este trabajo, a las concentraciones utilizadas, mediante curvas de viabilidad celular utilizando el bioensayo colorimétrico de reducción de sales de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium (MTT, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

Después de los debidos tiempos de estimulación, se lavaron las células en PBS frío y luego se lisaron utilizando una solución de lisis consistente en EDTA 2 mM, NP-40 (Sigma) al 1%, desoxicolato de sodio (Sigma) al 0,5%, dodecil sulfato de sodio (Sigma) al 0,2%, NaCl (Sigma) 150 mM, Tris HCl (Sigma) 50 mM pH 7,4, en presencia de fluoruro de fenilmetilsulfonil (Sigma) 2 mM, pepstatina (Sigma) 2 mg/mL, leupeptina (Sigma) 2 µg/mL, NaF 5 mM, ortovanadato de sodio (Sigma) 1 mM y NEM 1 mM a 4°C. Los lisados fueron incubados durante 10 min. en hielo y luego centrifugados a 19.000 g durante 10 minutos a 4°C. Luego se determinó la concentración de proteínas totales utilizando el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Los distintos lisados celulares se mezclaron con tampón de carga (4X) y β-mercaptoetanol (Concentración final 5%), llevando éste a la concentración 1X, para finalmente ser almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% utilizando un equipo de electroforesis *Mini-Protean III* (Bio-Rad) y transferidas a membranas de difluoro-polivinilideno (PVDF, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, EEUU) activada en metanol durante 1 minuto y transferidas a 20 Volt durante 12 horas.

Las membranas luego se incubaron durante 45 min con solución de bloqueo (leche baja en grasas en polvo al 5%, 20 mM Tris-HCl [pH 7,6], NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1%), luego se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos, c-Jun (Calbiochem), ERK (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EEUU), pERK (Upstate), pJNK (Upstate), y JNK (Santa Cruz Biotechnology), diluidos 1:1000 en

TBS-Tween-20 al 0,1% y leche descremada al 3% durante 12h a 4°C con agitación. En algunos casos se utilizó β -actina como control de carga (1:10.000; *Sigma*). Al cabo de este tiempo las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con solución de lavado (Tween-20 al 0,1% en TBS). Posteriormente las distintas membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos conjugados a peroxidasa (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ, EEUU), durante 1 hora a temperatura ambiente a razón de 1:5.000 en solución de bloqueo. Se repitió el lavado de las membranas como se indicó anteriormente y se detectaron los complejos antígeno-anticuerpo por un sistema comercial de quimioluminiscencia (*Perkin Elmer Life Sciences*) comercial y la detección se realizó con películas fotográficas (*Kodak*). Luego, las películas fueron digitalizadas y cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando el software *KODAK Molecular Imaging Software*, version 4.0 (MI 4.0).

Una vez finalizado este procedimiento las membranas PVDF se trataron con una solución de bloqueo y azida al 0,1% a temperatura ambiente durante 45 min, para remover los anticuerpos unidos. Las membranas se lavaron con TBS-Tween al 0,1%, se bloquearon durante 1 hora con solución de bloqueo e incubaron nuevamente con anticuerpos dirigidos contra las formas totales de las proteínas o β -actina, utilizándolos como control de carga de proteínas en el gel.

5.8 Experimentos de Transducción de Señales

Para identificar las vías de transducción de señales involucradas en la producción de uPA, las células fueron incubadas en presencia de SP600125

(Biolmol, Plymouth Meeting, PA, EEUU) (inhibidor de JNK), PD98059 (Calbiochem) (inhibidor de ERK), SN50 (Calbiochem) (inhibidor de NFκB), y SN50M (Calbiochem) (péptido control), para luego ser estimuladas con TNF-α o t-BOOH, dependiendo del experimento, a los tiempos indicados descritos en la sección de resultados.

5.9 Detección de la producción de uPA a través de Western-blot

Para evaluar la producción de uPA a nivel de la proteína, se colectaron 2 mL de medio condicionado de células en cultivo apropiadamente estimuladas. Estos medios fueron debidamente concentrados hasta un volumen de 200 μL utilizando un tubo de ultracentrífuga (Millipore, Bedford, MA, EEUU) a 1.500 g por 20 minutos a 4°C. Los medios condicionados concentrados fueron sujetos a electroforesis en geles de SDS-policacrilamida al 10% (BioRad), utilizando condiciones desnaturalantes y transferidos a membranas de PVDF. Estas fueron luego expuestas a anticuerpos primarios contra uPA (American Diagnostica, Temecula, CA, EEUU), anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa y finalmente revelados utilizando un sistema comercial de quimoluminiscencia (Perkin Elmer Life Sciences). Se utilizó β-actina en el lisado celular como control de carga.

5.10 Efecto de ROS en la activación y producción de uPA.

Para identificar si los ROS estaban involucrados en la activación y producción de uPA, las células fueron incubadas durante 1 hora en presencia del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC, Sigma), el inhibidor de la NADPH oxidasa Difenil iodinium (DPI,

Sigma) y la enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno molecular y agua, Catalasa (Sigma), para luego ser estimuladas con TNF- α a los tiempos indicados descritos en la sección de resultados. La actividad de uPA secretada en cultivos celulares fue determinada mediante zimografía caseinolítica⁷⁹ de los medios condicionados. Se detectó la producción de uPA a través de Western-blot con las mismas condiciones anteriormente descritas.

5.11 Determinación de la producción de H_2O_2 por TNF- α

Se sembraron FGH en placas de 96 pozos y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C hasta alcanzar 70% de confluencia. Luego se mantuvieron en medio libre de SFB y sin rojo fenol en presencia o ausencia de DPI, NAC, SP600125, Triclosán y TNF- α , según el experimento respectivo. Posteriormente se lavaron las células utilizando PBS y se reemplazó por el mismo medio suplementado con el fluoróforo 2,7-Dicloro-dihidro-fluorecein-diacetato (DCFH-DA, Sigma), como indicador del estado redox intracelular. La solución de 25 μ M DCFH-DA fue incubada durante media hora y luego se lavaron las células tres veces nuevamente con PBS 1X y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon, TE-2000) o lisadas en NaOH 0,2 N durante 5 minutos para luego ser traspasadas a una placa de 96 pozos especial para mediciones fluorométricas (Fluoronunc) y finalmente cuantificadas en un fluorímetro (Spectra MAX Gemini EM, Molecular Devices) a λ 480 nm de excitación, λ 530 nm emisión y λ 495 nm de cut-off (se descarta todo lo que

está por debajo de esta longitud de onda, lo que le otorga especificidad a la medición).

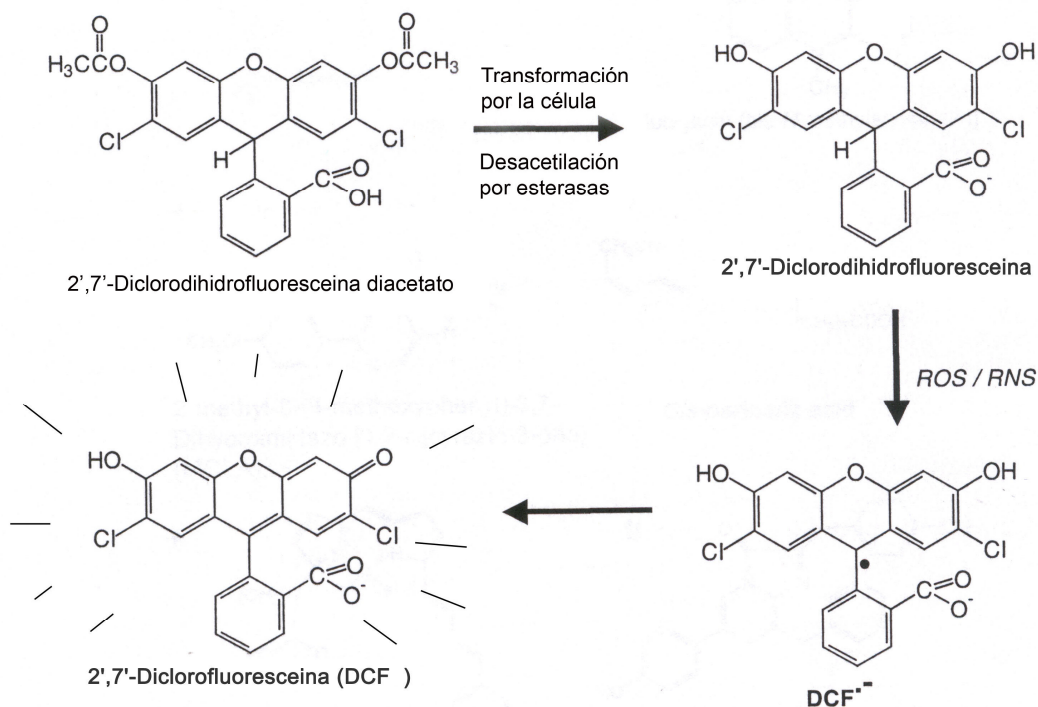


Figura 3. Esquema de conversión de Diclorodihidrofluoreceina-diacetato.

DCFH-DA penetra la membrana celular, es desacetilado por esterasas intracelulares y luego oxidado por el H_2O_2 al indicador fluorescente del estado redox intracelular Diclorofluoresceína (DCF').

5.12 Expresión de Resultados y análisis estadístico.

Los resultados experimentales se expresaron como el promedio +/- el error estándar o como resultados representativos utilizando un número (n) de al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística para cada set de datos fue analizada utilizando el test T de Student, con el nivel de significancia igual a $p < 0,05$ para todos los experimentos exceptuando los indicados con $p < 0,01$, considerando a estas como diferencias estadísticamente significativas.

6. RESULTADOS

6.1. Triclosán inhibe la actividad y expresión de uPA junto con la generación de plasmina activa estimuladas por TNF- α en fibroblastos gingivales humanos

Se estimularon FGH con una serie de concentraciones de TNF- α y se recogieron los medios condicionados después de 48 horas. Estos fueron analizados por zimografía de caseína. Como se muestra en la Figura 4A, TNF- α indujo un aumento dosis dependiente en la actividad de uPA. Debido a que el aumento más potente en esta fue con la concentración de 20 ng/mL de TNF- α , se seleccionó esta dosis de la citoquina como estímulo, para analizar el efecto de diferentes concentraciones de Triclosán en la actividad de uPA. Se expuso a fibroblastos gingivales a un rango de concentraciones de Triclosán (0,25 – 1,0 μ g/mL) durante 1 hora y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α en el mismo medio. El análisis de los medios condicionados por 48 horas a través de zimogramas caseinolíticos, demostró que la actividad de uPA estimulada por TNF- α fue efectivamente inhibida por Triclosán de una forma dosis dependiente (Figura 4B).

La cuantificación densitométrica de las bandas de uPA obtenidas a partir de tres experimentos independientes, demostró que TNF- α indujo un aumento significativo en la actividad de uPA ($p < 0,01$) y que así también, 1,0 μ g/mL de Triclosán reduce significativamente esta actividad ($p < 0,01$) (Figura 4C).

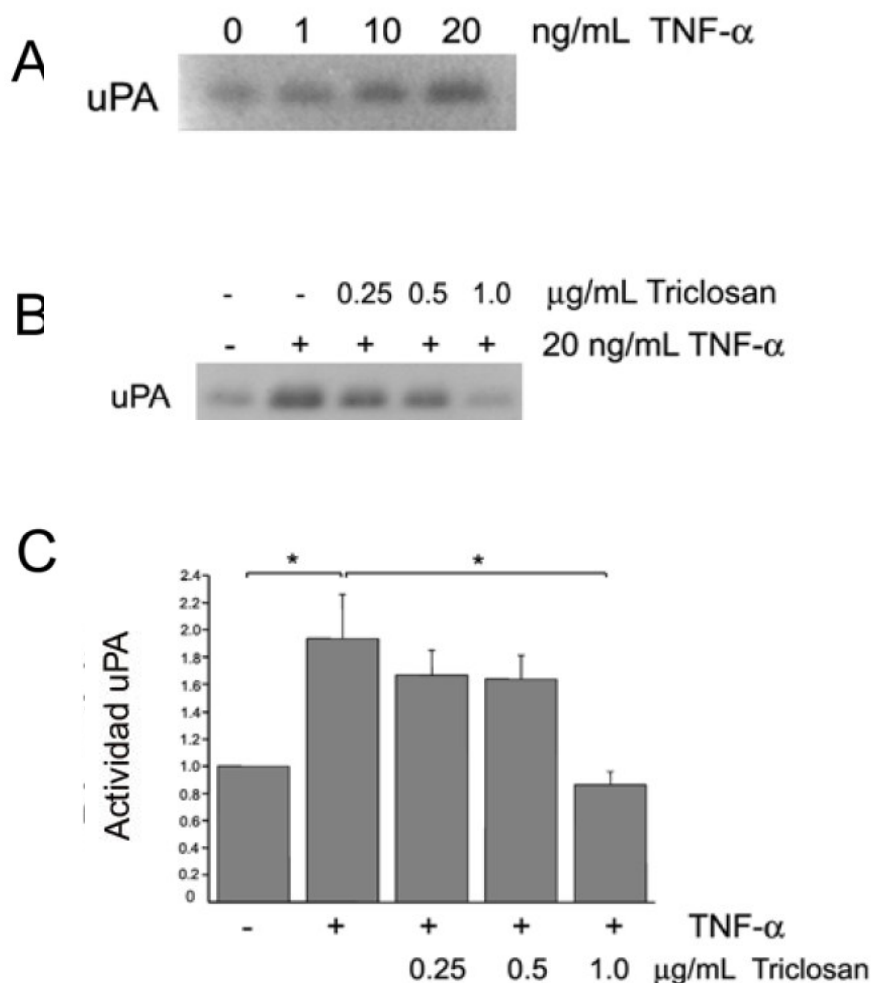


Figura 4. Triclosán inhibe la actividad de uPA estimulada por TNF- α en FGH.

Se estimularon FGH con un rango de concentraciones de TNF- α (1 - 20 ng/mL). En un set de experimentos paralelos, las células fueron expuestas a Triclosán (0,25 – 1 μ g/mL), 1 hora antes del estímulo con TNF- α . Después de 48 horas, la actividad de uPA presente en los medios condicionados fue analizada a través de zimografía para caseína como está descrito en materiales y métodos (A y B). Se realizó un análisis cuantitativo de las bandas de uPA. Los análisis densitométricos muestran la actividad de uPA. Los valores corresponden al promedio y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre la condición estimulada con TNF- α y la indicada (C). $p < 0,01$ n=3.

Debido a que uPA posee un rol importante en la conversión del zimógeno plasminógeno a plasmina, probamos si Triclosán modula la generación de plasmina

activa. Fibroblastos gingivales privados de SFB fueron expuestos a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de Triclosán por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$.

Después de 48 horas se analizaron mediante el ensayo de difusión radial los medios condicionados provenientes de las células control, $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{TNF-}\alpha$ + Triclosán. Esta aproximación experimental evalúa el balance entre uPA y su inhibidor PAI-1 en términos de la conversión del plasminógeno en plasmina⁷⁹. Como se muestra en la Figura 5A, la actividad aumentada de uPA por $\text{TNF-}\alpha$, fue capaz de estimular la conversión de plasminógeno en plasmina, y Triclosán efectivamente inhibió esta respuesta. El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostró que ambas respuestas poseían significancia estadística ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 5B).

Para probar si el efecto de $\text{TNF-}\alpha$ y Triclosán observado en la actividad de uPA se correlaciona a nivel de proteína, FGH privados de SFB fueron expuestos a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de Triclosán durante 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$.

Después de 48 horas, el medio condicionado fue concentrado y la actividad y niveles de proteína de uPA fueron evaluados con zimogramas de caseína y Western-blot, respectivamente. Como se muestra en la Figura 5C, los zimogramas de caseína y Western-blot demostraron un alto nivel de correlación, y se confirmó los resultados obtenidos anteriormente con respecto al efecto de $\text{TNF-}\alpha$ y Triclosán en la actividad de uPA y los niveles de proteína de ésta. El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostraron que el efecto de $\text{TNF-}\alpha$ y Triclosán en la producción de uPA alcanza niveles significativos ($p < 0,01$) (Figura 5D). A pesar de que la actividad y

producción de uPA fueron estimulados levemente por Triclosán en ausencia de TNF- α (Figura 5C), la cuantificación de estas respuestas no mostraron un efecto estadísticamente significativo en comparación a la condición control (Figura 5D).

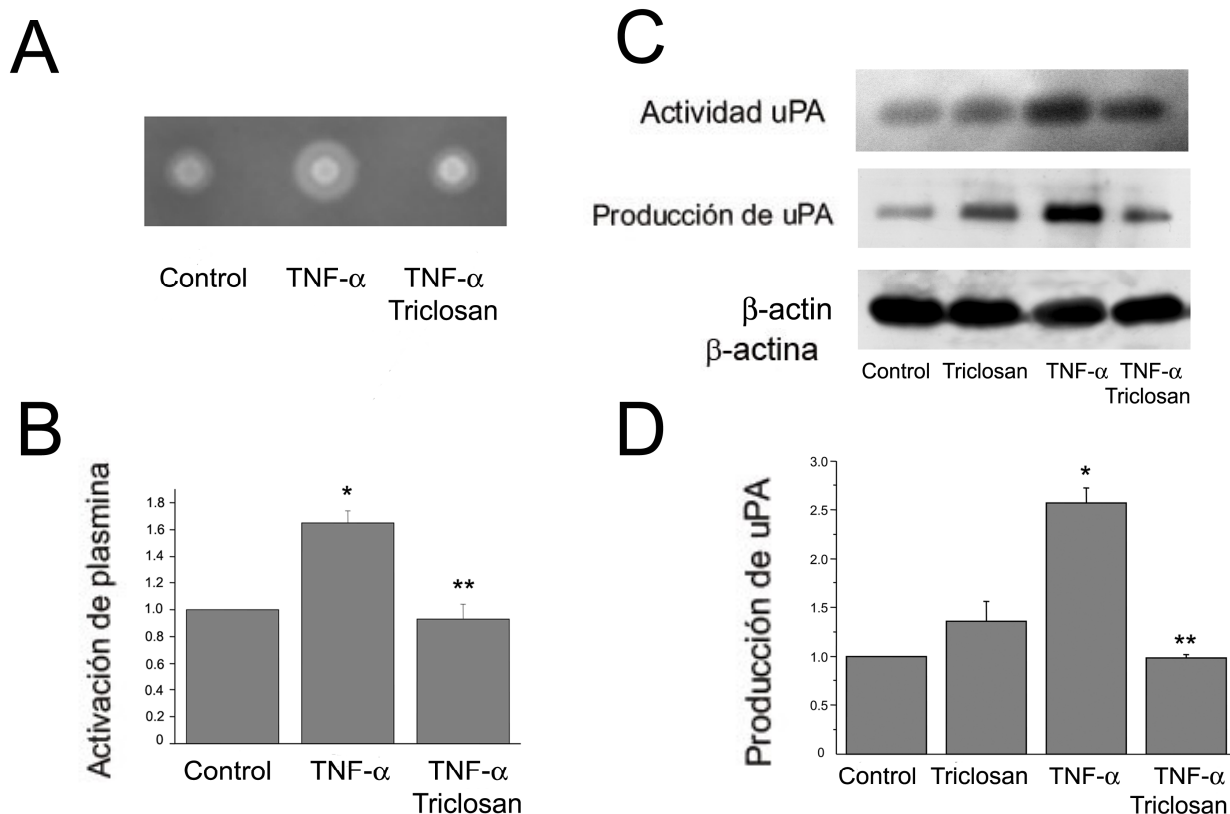


Figura 5. Triclosán inhibe la producción de uPA y la activación de plasmina estimuladas por TNF- α en FGH.

FGH fueron expuestos a 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora antes de la estimulación con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, se evaluó la capacidad del medio condicionado de estimular la conversión de plasminógeno a plasmina a través de un ensayo de difusión radial (**A**). El análisis densitométrico muestra la actividad proteolítica derivada de plasmina. Estos datos fueron expresados como los promedios y el error estándar (**B**). FGH fueron expuestos a 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α por 48 horas. La actividad y producción de uPA fueron evaluadas a través de zimografía de caseína y Western-blot, respectivamente. Se utilizó a β -actina como control de carga (**C**). Se realizó un análisis cuantitativo de las bandas de uPA derivados de los Western-blots. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar normalizadas con respecto a β -Actina. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la situación control y el doble asterisco (**) es contra la condición estimulada (**D**) $p < 0,05$ $n=3$.

Para evaluar el efecto de Triclosán a un nivel transcripcional, FGH libres de SFB fueron expuestos a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de Triclosán durante 1 hora y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$. Después de 8 horas, se analizaron los niveles del ARNm de uPA utilizando RT-PCR. La Figura 6 muestra un resultado representativo derivado de tres experimentos independientes que revelaron que $\text{TNF-}\alpha$ posee la habilidad de inducir la expresión del ARNm de uPA. En presencia de Triclosán la expresión del ARNm de uPA, a las 8 horas de estímulo, se inhibió.

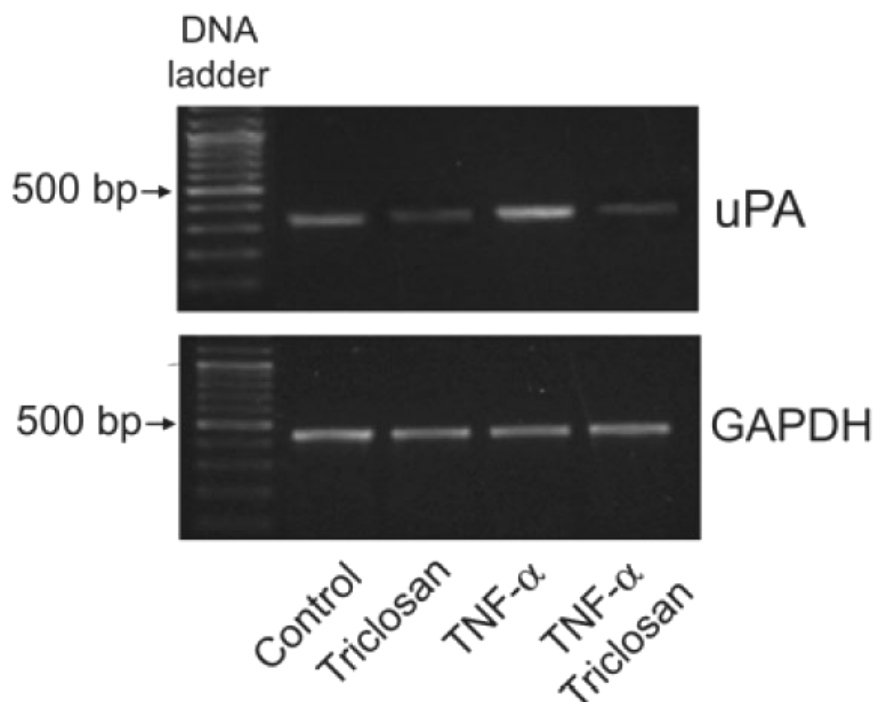


Figura 6. Triclosán inhibe la expresión del ARNm de uPA estimulada por $\text{TNF-}\alpha$ en FGH.

FGH fueron expuestos a 1 $\mu\text{g/mL}$ de Triclosán por 1 hora y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$ por 8 horas. Luego, las células fueron lisadas y se extrajo su ARNm como se describe en Materiales y Métodos. Se analizaron los niveles de expresión del ARNm para uPA y GAPDH a través de RT-PCR semi cuantitativo. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

6.2. La ruta de NFκB está involucrada en la producción de uPA estimulada por TNF-α, pero no es alterada por Triclosán.

Estudios previos han demostrado que la ruta de NFκB posee un rol en la regulación de la producción de uPA en distintos tipos celulares⁸⁰. Para estudiar la participación de esta ruta en la producción de uPA, FGH privados de SFB fueron expuestos a SN50, un péptido permeable a la membrana celular que posee la secuencia de localización nuclear de la subunidad p50 de NFκB y por ende es capaz de interrumpir su respuesta de señalización secuestrando esta subunidad en el citoplasma⁸¹. Como control se utilizó SN50M, un péptido mutante no funcional. Después de la exposición de las células a estos péptidos, estas fueron estimuladas con 20 ng/mL de TNF-α durante 48 horas y se evaluó la actividad de uPA en los medios condicionados a través de zimografía caseinolítica.

Como se muestra en la Figura 7A, SN50 efectivamente inhibió la actividad de uPA estimulada con TNF-α en FGH. En presencia del péptido control (SN50M), la actividad de uPA estimulada por TNF-α no fue alterada. El análisis estadístico de tres experimentos independientes mostró que SN50, pero no SN50M, inhibe la actividad de uPA estimulada con TNF-α de forma significativa (Figura 7B). De manera de verificar la activación de la ruta de NFκB en FGH, estas fueron estimuladas con TNF-α y la translocación de la subunidad p65 de NFκB desde el citoplasma hacia el núcleo fue verificada utilizando inmunofluorescencia.

Como se muestra en la Figura 7C, las células no estimuladas no mostraron presencia nuclear de la subunidad p65. Después de 15 y 30 minutos de la

estimulación con TNF- α , una alta proporción de células mostró una fuerte tinción nuclear inmunofluorescente para p65, sugiriendo que esta ruta es efectivamente activada por esta citoquina. Se cuantificó la proporción de células con una marca nuclear para p65 en tres experimentos independientes (Figura 3D). La translocación de la subunidad p65 alcanzó niveles similares después de 15 y 30 minutos de estímulo (Figura 7D). Con el fin de comprobar si Triclosán podía afectar la translocación de la subunidad p65, las células fueron previamente tratadas durante 1 hora con 1 μ g/mL de Triclosán para luego ser estimuladas con 20 ng/mL de TNF- α durante los mismos tiempos anteriores. Este experimento no mostró ningún cambio observable en la destinación nuclear de p65 (data no mostrado), lo que sugiere que Triclosán no afecta la activación de la ruta de NF κ B.

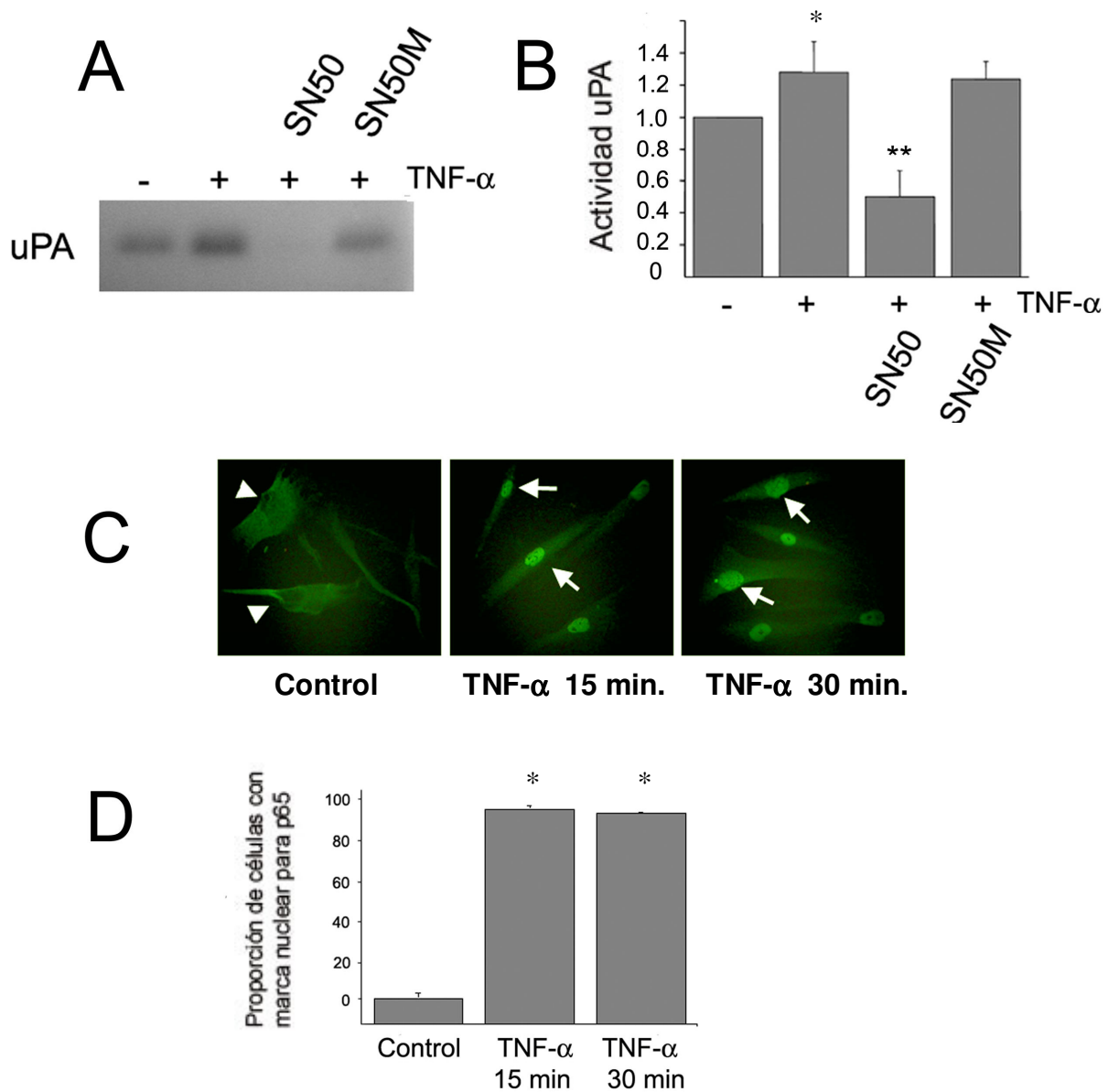


Figura 7. NF κ B está involucrado en la producción de uPA estimulada por TNF- α pero no es afectado por Triclosán.

FGH fueron expuestos a 50 μ g/mL de SN50 y SN50M por 1 hora y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, la actividad de uPA presente en los medios condicionados fue analizada a través de zimografía para caseína como se describe en Materiales y Métodos (A). Se realizó un análisis cuantitativo de las bandas de uPA. Estos datos obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar (B). FGH fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α y se analizó la translocación de la subunidad p65 a través de inmunofluorescencia como se describe en Materiales y Métodos (C). Se realizó un análisis cuantitativo del número de células con marcaje nuclear para p65 positivo. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. (*) El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) es contra la condición estimulada con TNF- α (D). $p < 0,05$ $n=3$.

6.3. La producción de uPA estimulada por TNF- α es dependiente de la actividad de la vía de señalización JNK.

Para identificar el rol de las vías ERK y JNK en la actividad de uPA estimulada con TNF- α , FGH libres de SFB fueron expuestos a un rango de concentraciones de los inhibidores selectivos de MEK-1 (PD98059; 5-25 μ M) y JNK (SP600125; 1-5 μ M) (Figura 8). Después de 30 minutos de preincubación con estos inhibidores, los fibroblastos gingivales fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α por 48 h y los medios condicionados fueron analizados mediante zimografía para caseína. En ausencia del estímulo con TNF- α , el tratamiento con 5 μ M de SP600125 solo ó 25 μ M de PD98059 no indujeron cambios significativos en la actividad de uPA (Figura 8A). Se analizó el efecto de PD98059 en la actividad de uPA estimulada con TNF- α , sin embargo ninguna de las concentraciones de esta droga alcanzaron diferencias significativas respecto a la situación control. Por otro lado, en el caso del inhibidor de JNK, SP600125, todas las concentraciones utilizadas (1-5 μ M), mostraron una inhibición significativa en la actividad de uPA estimulada por TNF- α ($p < 0,05$) (Figura 8A).

Para verificar el efecto de SP600125 en la producción de uPA estimuladas por TNF- α a nivel de la proteína, FGH deprivados de SFB fueron expuestos a 5 μ M de SP600125 por 30 minutos y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, el medio condicionado fue concentrado y los niveles de proteína de uPA fueron analizados con Western-blot. Como se muestra en la Figura 8B, el Western-blot demostró que SP600125 efectivamente inhibe el estímulo de

TNF- α en la producción de uPA. El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostraron que SP600125 inhibe significativamente la producción de uPA respecto a la situación estimulada ($p < 0,05$) (Figura 8C).

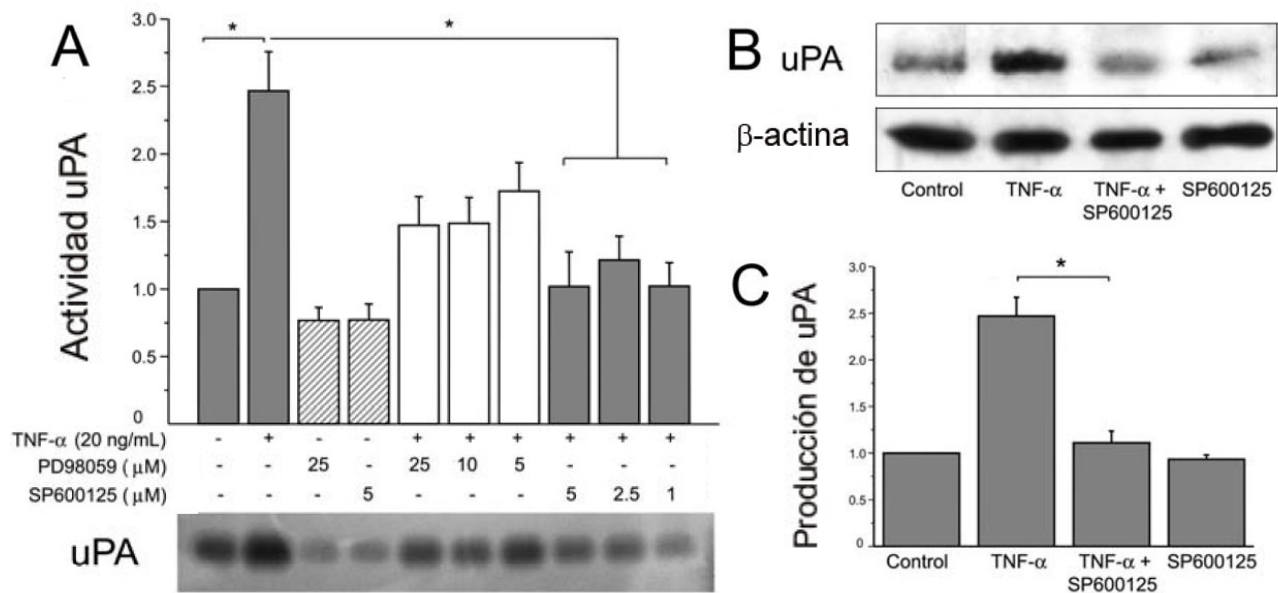


Figura 8. La inhibición de la ruta JNK interfiere en la producción de uPA estimulada por TNF- α .

FGH fueron incubados en presencia de SP600125 (1-5 μ M) o PD98059 (5-25 μ M) por 1 hora y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Los medios condicionados fueron analizados con zimografía de uPA. Se cuantificaron las bandas caseinolíticas para ser expresadas en el gráfico como promedios y error estándar (**A**). FGH fueron incubados en presencia de 5 μ M de SP600125 por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α por 48 horas. Los medios condicionados fueron analizados a través de Western-blot para uPA. Se utilizó β -actina como control de carga (**B**). Se realizó un análisis densitométrico del Western-blot. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios normalizados con β -Actina y error estándar (**C**). (*) El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas. $p < 0,05$ $n=3$.

6.4. Triclosán inhibe la activación de la vía de señalización JNK en fibroblastos gingivales.

Para comprobar si las condiciones experimentales que promueven la expresión de uPA se correlacionaban con la activación de las vías ERK y JNK por

TNF- α , se estimularon FGH deprivados de SFB con 20 ng/mL de TNF- α y se evaluó la activación de las rutas antes mencionadas a través de Western-blot de los lisados celulares a diferentes puntos en el tiempo. Como se puede apreciar en la Figura 9A, la estimulación de las células con TNF- α no indujo un aumento significativo en la fracción fosforilada de ERK-1/2. Por otro lado, TNF- α fue capaz de estimular la fosforilación de JNK2 siguiendo un patrón bimodal. Se observó un aumento consistente en la fosforilación de JNK2 a los 5 minutos de estímulo, seguido por una disminución en la cantidad de p-JNK2 a los 15 y 30 minutos, y finalmente un segundo aumento más consistente a los 60 y 180 minutos de estimulación con TNF- α . Este patrón de la activación de JNK fue observado en al menos cuatro experimentos independientes y mostraron ser muy consistentes entre sí.

Para identificar si Triclosán era capaz de modificar la activación/fosforilación de JNK2, se obtuvieron FGH deprivados de SFB y fueron expuestos a 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora. Luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α a diferentes tiempos. Como se demuestra en la figura 9A, observamos una disminución en la fosforilación de JNK2 a lo largo de todos los tiempos experimentales evaluados. Estos datos en conjunto sugieren la participación activa de la ruta JNK en la producción de uPA estimulada con 20 ng/mL de TNF- α (Figura 8) y que Triclosán puede afectar la activación de esta ruta de señalización. Para evaluar cuantitativamente el efecto de Triclosán en la ruta de JNK2, se expusieron FGH privados de SFB a Triclosán por 1 hora y luego fueron estimulados con 20 ng/mL TNF- α . Después de 60 minutos, se lisaron las células y se evaluó la fosforilación de

JNK2 utilizando Western-blot. La Figura 9B muestra que Triclosán consistentemente inhibe la fosforilación de JNK2 en este período de tiempo. El análisis de cinco experimentos independientes, realizados con cultivos celulares derivados de pacientes diferentes (Figura 9B), demostraron que esta inhibición es estadísticamente significativa (Figura 9C).

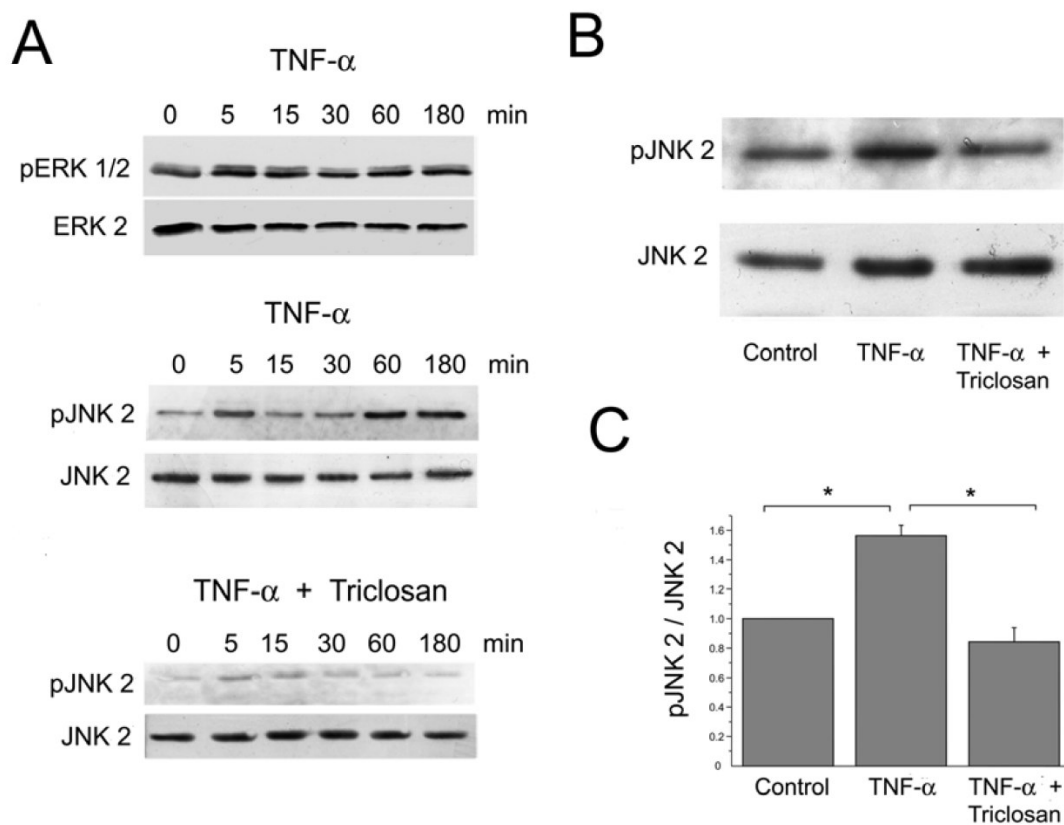


Figura 9. Triclosán altera la fosforilación de JNK estimulada por TNF- α

FGH fueron expuestos, o no, a 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α a distintos tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 180 min.). Se evaluaron las formas fosforiladas de ERK-1/2 y JNK en los lisados celulares. Como control de carga, se evaluó la expresión total de ERK y JNK (A). FGH fueron expuestos, o no, a 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α por 60 min. Se analizó la presencia de p-JNK2 en los lisados celulares a través de Western-blot. Como control de carga se detectó la presencia de JNK total (B). Después del análisis densitométrico de p-JNK, normalizadas con respecto a JNK2 total fueron expresadas como promedios y error estándar. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. (*) El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (C). $p < 0,01$ $n=5$.

Considerando el efecto inhibitorio de Triclosán en la activación/fosforilación de JNK2, evaluamos el efecto de esta droga sobre la expresión del factor transcripcional c-Jun. Se ha demostrado que c-Jun activo induce la expresión incluso de sí mismo. De esta manera, la expresión de c-Jun representa un ensayo funcional efectivo para la actividad de JNK⁸². Se expusieron fibroblastos gingivales privados de SFB a 1 µg/mL de Triclosán por 1h y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF-α. Después de 12 horas, las células fueron lisadas y la producción de c-Jun fue evaluada a través de Western-blot. Como se observa en la figura 10A, TNF-α fue capaz de estimular la producción de c-Jun y Triclosán efectivamente inhibió este aumento en la expresión de la proteína. El análisis de tres experimentos independientes demostraron que esta inhibición es estadísticamente significativa (Figura 10B). En ausencia de TNF-α, Triclosán no indujo variaciones significativas en la producción de c-Jun.

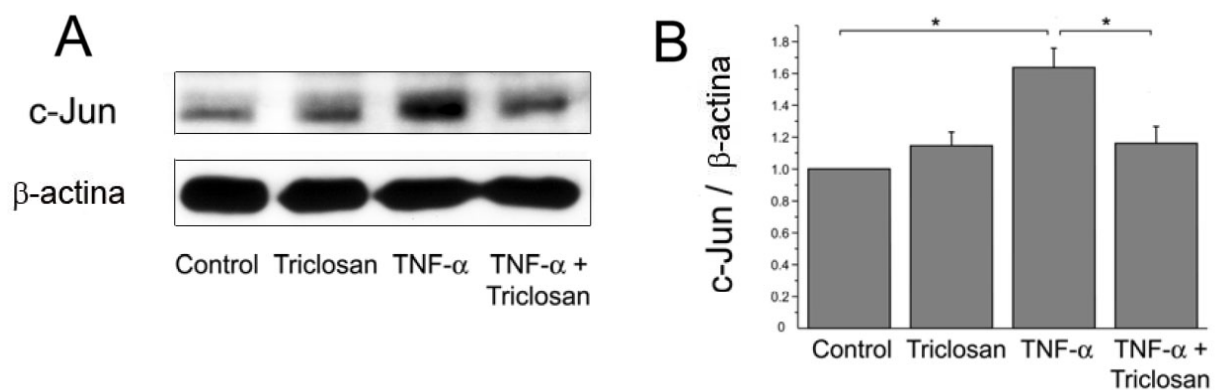


Figura 10. Triclosán inhibe la producción de c-Jun estimulada por TNF-α

FGH fueron expuestos, o no, a 1 µg/mL de Triclosán por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF-α. Después de 12 horas, se evaluó la producción de c-Jun en los lisados celulares mediante Western Blot. Se utilizó β-actina como control de carga (A). Se realizó el análisis cuantitativo de las bandas de c-Jun derivadas de los Western-blot. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. (*) El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (B). p<0,05 n=3.

6.5. La producción y actividad de uPA estimulada por TNF- α depende del estado redox intracelular y la presencia de peróxido en el medio extracelular en fibroblastos gingivales humanos.

Para identificar si el estado redox intracelular afecta la actividad de uPA estimulada con TNF- α , FGH libres de SFB fueron expuestos a 30 mM del antioxidante y precursor de Glutación (GSH), N-Acetil-L-Cisteína (NAC). NAC es el aminoácido L-cisteína más un grupo acetilo (-CO-CH₃), el cual aumenta la absorción y solubilidad de este agente, acoplado al grupo amino del aminoácido. Glutación (GSH, L-gamma-glutamil-L-cisteinilglicina) es la molécula antioxidante predominante en la fase acuosa del citoplasma celular⁸³. Este es sintetizado a partir de tres aminoácidos en un proceso de dos etapas, comenzando por la combinación de ácido glutámico y cisteína, y finalizando con la adición de glicina. Tanto ésta como el ácido glutámico son abundantes en las células y por ende es la disponibilidad de cisteína la que controla la razón entre los reactivos de síntesis. Después de 60 minutos de pre incubación con este antioxidante capaz de atravesar membranas e ingresar a la célula, los fibroblastos gingivales fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α durante 48 h y los medios condicionados fueron analizados con zimografía para caseína (Figura 11A). En la ausencia del estímulo de TNF- α , el tratamiento con 30 μ M de NAC indujo un pequeño aumento en la actividad de uPA que no alcanzó diferencias significativas (Figura 11B). En la situación estimulada se logró evaluar que NAC inhibe significativamente la actividad de uPA en comparación a la condición estimulada.

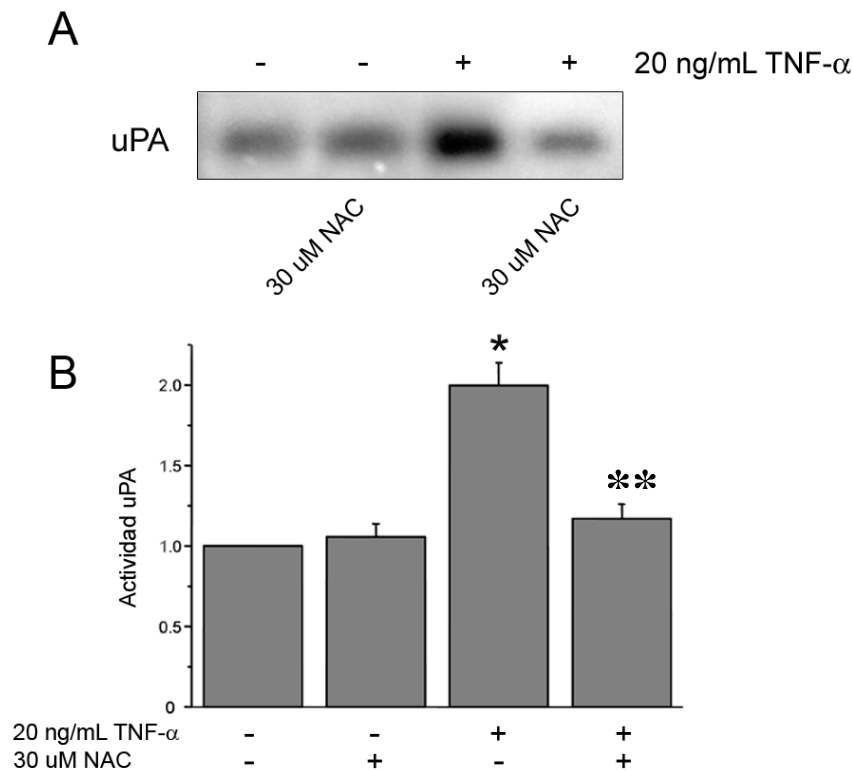


Figura 11. NAC inhibe la actividad de uPA estimulada por TNF- α

FGH fueron expuestos, o no, a 30 μ M de NAC por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, se evaluó la actividad de uPA en los medios de cultivo condicionados (**A**). Se realizó el análisis cuantitativo de las bandas de degradación de caseína derivadas de la zimografía. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes, fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con TNF- α (**B**). $p < 0,05$ $n = 3$.

Para verificar el efecto de NAC en la producción de uPA estimuladas por TNF- α a nivel de proteína, se expusieron FGH privados de SFB a 30 μ M de NAC durante 60 minutos y luego fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, el medio condicionado fue concentrado y los niveles de proteína de uPA fueron analizados por medio de Western-blot. Como se muestra en la Figura 12A, el Western-blot demostró que el pre-tratamiento con NAC efectivamente inhibió el estímulo de TNF- α en la producción de uPA. El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostró que el efecto de NAC en la producción de uPA

provocó una inhibición significativa respecto a la situación estimulada ($p < 0,01$) (Figura 12B).

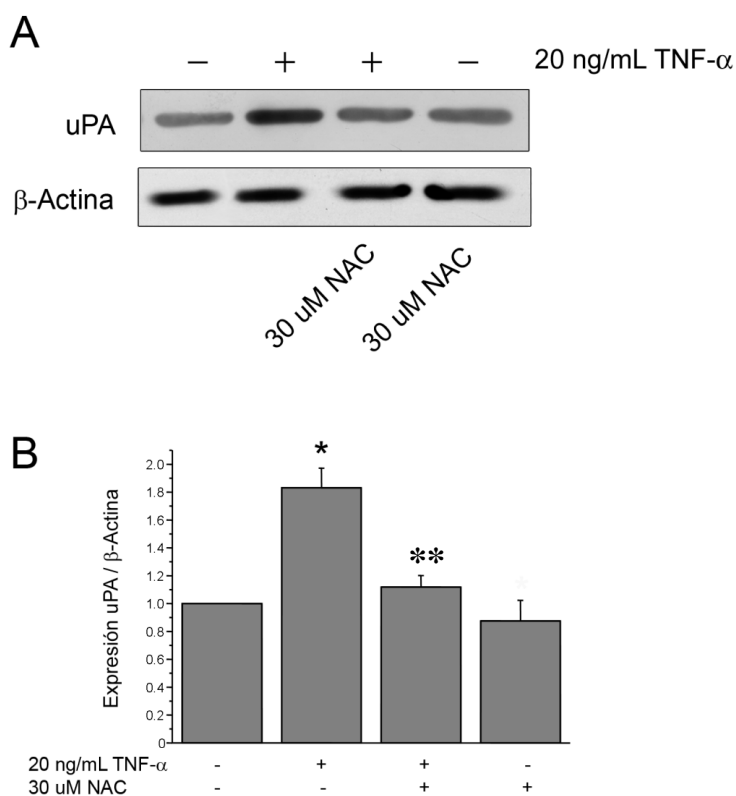


Figura 12. NAC inhibe la expresión de uPA estimulada por TNF- α

FGH fueron expuestos, o no, a 30 μ M de NAC por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, se evaluó la expresión de uPA en los medios condicionados. Se utilizó a β -actina como control de carga (**A**). Se realizó el análisis cuantitativo de los Western-blot. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con TNF- α (**B**). $p < 0,01$ $n=3$.

Para evaluar si la actividad de la enzima NADPH oxidasa, uno de los principales productores del radical superóxido O_2^- , precursor directo de la producción de H_2O_2 , afecta la actividad de uPA estimulada con TNF- α , FGH libres de SFB fueron expuestos a 10 y 20 μ M del fármaco inhibidor de la NADPH oxidasa, Difenil iodinium (DPI) durante 60 minutos. Luego, los FGH fueron estimulados con 20 ng/mL de TNF-

α durante 48 h y los medios condicionados fueron analizados mediante zimografía de caseína (Figura 13A). En ausencia del estímulo de TNF- α , el tratamiento con 10 y 20 μ M de DPI no indujo un aumento significativo en la actividad de uPA (Figura 13B). El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes determinó que el efecto de 20 μ M de DPI en la actividad de uPA mostró una inhibición significativa respecto a la situación estimulada ($p < 0,05$), sin embargo no se observaron diferencias significativas al preincubar con 10 μ M de DPI con respecto a la situación control (Figura 13B).

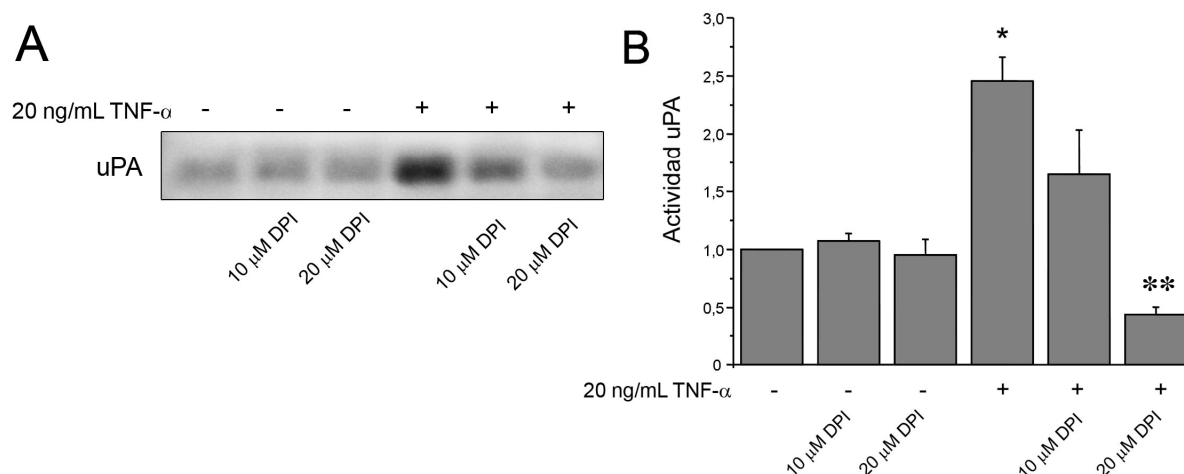


Figura 13. DPI inhibe la activación de uPA estimulada por TNF- α

FGH fueron expuestos, o no, a DPI (10 y 20 μ M) μ g/mL por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, se evaluó la actividad de uPA en los medios condicionados (**A**). Se realizó el análisis cuantitativo de las bandas de degradación de caseína derivadas de la zimografía. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con TNF- α (**B**). $p < 0,05$ $n = 3$.

Para analizar si la producción y presencia de H₂O₂ afectaba la actividad de uPA, se preincubaron fibroblastos gingivales privados de SFB con concentraciones

crecientes de catalasa (750, 1500 y 3000 U/mL), enzima antioxidante que no posee la capacidad de penetrar membranas celulares y por ende permanece en el medio de cultivo durante todo el experimento, que induce la conversión del peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua. Después de 60 minutos de preincubación con esta enzima, se estimularon los FGH con 20 ng/mL de TNF- α y se recogieron los medios condicionados después de 48 horas. Estos fueron analizados mediante zimografía para uPA. Como se muestra en la Figura 14A, TNF- α indujo un aumento significativo en la actividad de uPA con respecto al control no estimulado. El análisis de los medios condicionados por 48 horas a través de zimogramas caseinolíticos, demostró que la actividad de uPA estimulada por TNF- α fue efectivamente inhibida por catalasa en una forma dosis dependiente (Figura 14B). La cuantificación densitométrica de las bandas de uPA obtenidas a partir de tres experimentos independientes, demostró que TNF- α indujo un aumento significativo en la actividad de uPA ($p < 0,01$) y que las concentraciones más altas de catalasa inhibieron la actividad de uPA estimulada por TNF- α de una forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

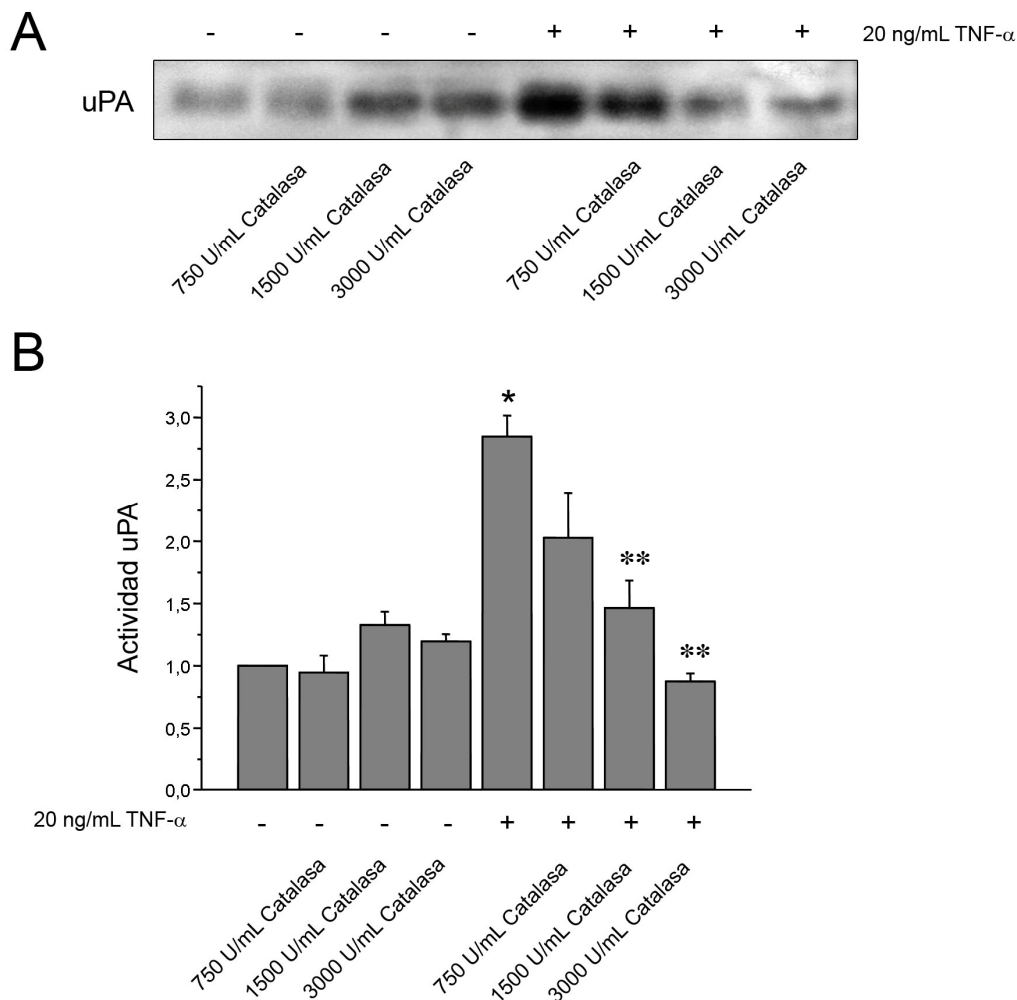


Figura 14. Catalasa inhibe la activación de uPA estimulada por TNF- α

FGH fueron expuestos, o no, a catalasa (750, 1500 y 3000 U/mL) por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 48 horas, se evaluó la actividad de uPA en los medios condicionados (A). Se realizó el análisis cuantitativo de las bandas de degradación de caseína derivadas de la zimografía. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con TNF- α (B). $p < 0,05$ $n=3$.

6.6. TNF- α induce la producción de H₂O₂ en FGH y Triclosán tiene la capacidad de inhibir esta producción.

Los procesos de generación de ROS pueden ser monitoreados utilizando métodos fluorométricos. La generación intracelular de ROS puede ser investigada

utilizando 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) como un compuesto bien caracterizado para detectar y/o medir la producción intracelular de H_2O_2 ⁸⁴. La conversión del agente no fluorescente DCFH-DA al compuesto altamente fluorescente DCF' ocurre en una serie de pasos. Primero, DCFH-DA es transportado a través de la membrana celular y desacetilado por esterasas intracelulares para producir el agente no fluorescente DCFH, el cual permanece atrapado en el compartimiento intracelular. Luego, DCFH es convertido a DCF' a través de la acción de peróxidos⁸⁵.

FGH fueron pre-incubados con Triclosán en medio de cultivo sin SFB y libre de rojo fenol durante 1 hora y luego estimulados con $TNF-\alpha$ durante 60 minutos. Posteriormente las células fueron incubadas durante 30 min. con medio suplementado con 25 μM DCFH-DA, como indicador del estado redox intracelular. Los FGH fueron lavados con PBS y lisados con NaOH 0,2 N durante 5 minutos para luego ser traspasadas a una placa de 96 pozos especial para mediciones fluorométricas y cuantificadas en un fluorímetro .

Como se muestra en la Figura 15, $TNF-\alpha$ indujo un aumento significativo en la producción de H_2O_2 intracelular con respecto al control no estimulado. Las mediciones fluorométricas demostraron que la producción de H_2O_2 estimulada por $TNF-\alpha$ fue efectivamente inhibida por Triclosán. La cuantificación de la fluorescencia obtenida a partir de tres experimentos independientes, demostró que $TNF-\alpha$ indujo un aumento significativo en la producción de H_2O_2 ($p < 0,05$) y que Triclosán inhibió esta producción de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Estos resultados

fueron confirmados visualizando las células estimuladas con TNF- α e incubadas con 25 μ M DCFH-DA en las mismas condiciones anteriores mediante un microscopio de fluorescencia invertido que permite hacer observaciones *in vivo* de la generación de ROS intracelular (Figura 16).

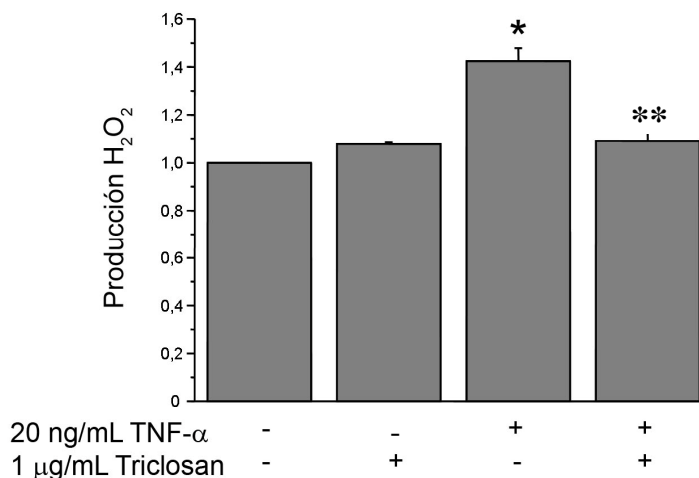


Figura 15. Triclosán inhibe la producción de H₂O₂ estimulada con TNF- α

FGH fueron expuestos, o no, a Triclosán (1 μ g/mL) por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de TNF- α . Después de 60 min. Los FGH fueron expuestos a DCFH-DA por 30 min. Se evaluó la generación de H₂O₂ intracelular mediante el análisis cuantitativo de la emisión de fluorescencia de los lisados celulares. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con TNF- α (B). p<0,05 n=3.

Para evaluar la contribución de la vía de transducción de señales JNK y la actividad de la NAD(P)H oxidasa en la producción de ROS intracelulares, se utilizó la observación *in vivo* de la emisión fluorescente de DCFH-DA. Para ello se utilizó el mismo protocolo que para las cuantificaciones con fluorímetro, exceptuando la lisis celular, y pre-incubando durante 60 min. con 1 μ g/mL de Triclosán, 5 μ M de SP600125, 20 μ M de DPI y 30 μ M de NAC como control, para luego ser estimuladas con TNF- α o t-BOOH como control positivo de la técnica durante 60 min.. Se incubó

con solución de 25 μM DCFH-DA por media hora y se observaron en microscopio de fluorescencia invertido (Figura16). Como se observa en esta figura, la vía JNK posee un rol importante en la producción de ROS intracelulares ya que al incubar con el inhibidor específico de esta vía, SP600125, se disminuyen los niveles de producción de estos, de forma similar a los cultivos preincubados con NAC, DPI y Triclosán.

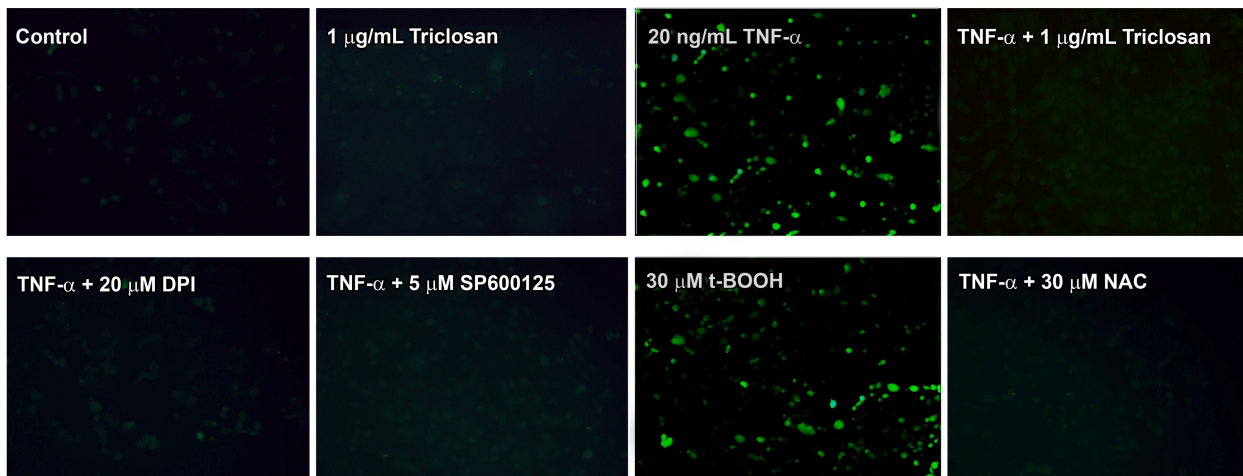


Figura 16. Efecto de Triclosán, NAD(P)H oxidasa, JNK y NAC en la producción de H_2O_2 estimulada con $\text{TNF-}\alpha$

FGH fueron expuestos, o no, a 1 $\mu\text{g/mL}$ Triclosán, 5 μM de SP600125, 20 μM de DPI y 30 μM de NAC por 1 hora y luego estimulados con 20 ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$. Después de 60 min. los FGH fueron expuestos a DCFH-DA por 30 min. Se evaluó la generación de H_2O_2 intracelular mediante la emisión de fluorescencia de los cultivos *in vivo* captada con un microscopio de fluorescencia invertido.

6.7. H_2O_2 exógeno induce la actividad de uPA y Triclosán revierte este aumento.

Para evaluar si el estímulo exógeno de H_2O_2 podía afectar la actividad y producción de uPA, se obtuvieron FGH privados de SFB los cuales se pre-incubaron con 1 $\mu\text{g/mL}$ de Triclosán durante 1 hora. Luego, estos fueron estimulados durante 48 horas con concentraciones crecientes (1, 10 y 30 μM) de Terbutil Peróxido (1,1-Dimetiletil Hidroperóxido, t-BOOH), un análogo orgánico de H_2O_2 con la capacidad de

ingresar a la célula con mayor facilidad. Los medios condicionados fueron analizados con zimografía para caseína (Figura 17A). El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostraron que t-BOOH posee un efecto de tipo dosis dependiente en el aumento de la actividad de uPA, y este es estadísticamente significativo con respecto a la situación control ($p < 0,05$). Además se demostró que Triclosán posee la capacidad de inhibir este aumento en la actividad provocada por t-BOOH para las tres concentraciones analizadas, pero estas sólo resultaron ser estadísticamente significativas para 10 y 30 μM de t-BOOH con respecto a la situación respectivamente estimulada ($p < 0,05$) (Figura 17B).

Para evaluar el efecto de t-BOOH en la producción de uPA a nivel de proteína, FGH privados de SFB fueron pre incubados con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Triclosán durante 60 minutos, para luego ser estimulados con 30 μM de t-BOOH. Después de 48 horas, el medio condicionado fue concentrado y los niveles de proteína de uPA y β -actina fueron analizados mediante Western-blot. Como se muestra en la Figura 17C, el Western-blot demostró que el pre-tratamiento con Triclosán efectivamente inhibió el estímulo de t-BOOH en la producción de uPA. El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostró que el efecto de Triclosán en la producción de uPA normalizado con respecto a β -actina fue una inhibición significativa respecto a la situación estimulada ($p < 0,05$) (Figura 17D).

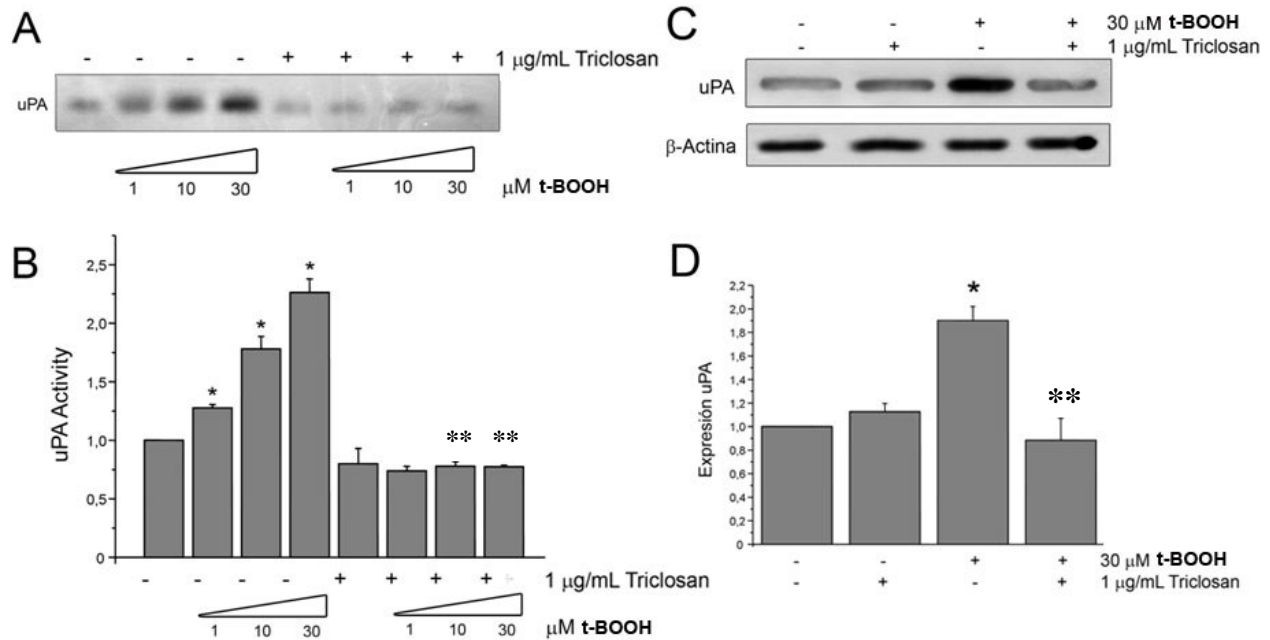


Figura 17. Triclosán inhibe la actividad y expresión de uPA estimulada por t-BOOH en FGH.

FGH fueron expuestos, o no, a 1 μg/mL Triclosán por 60 min. y luego estimulados con 1, 10 y 30 μM de t-BOOH. Después de 48 horas, se evaluó la actividad de uPA en los medios condicionados (A) y la expresión de uPA y β-Actina (C). Se realizó el análisis cuantitativo de las bandas de degradación de caseína derivadas de la zimografía y Western-blot. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con 30 μM de t-BOOH (B y D). $p < 0,05$ $n=3$.

6.8. La actividad de uPA estimulada por H₂O₂ exógeno es dependiente de la actividad de la vía de señalización de ERK y es inhibida por Triclosán.

Para identificar el rol de la vía ERK-1/2 en la actividad de uPA estimulada con t-BOOH, FGH libres de SFB fueron expuestos a 30 μM del inhibidor selectivo de MEK-1 (PD98059) (Figura 18A). Después de 60 minutos de preincubación con este inhibidor, los fibroblastos gingivales fueron estimulados con 30 μM de t-BOOH por 48 horas y los medios condicionados fueron analizados con zimografía para uPA. En ausencia del estímulo de t-BOOH el tratamiento con PD98059 indujo una reducción

limitada en la actividad de uPA que no alcanzó una diferencia significativa. Como se muestra en la Figura 18B, se demostró que PD98059 efectivamente inhibió el estímulo de t-BOOH en la producción de uPA. El análisis cuantitativo de tres experimentos independientes mostró que el efecto de 30 μ M PD98059 en la actividad de uPA fue una inhibición significativa respecto a la situación estimulada ($p < 0,05$), y esta inhibición es comparable cuantitativamente a la disminución en la actividad de uPA al preincubar con 1 μ g/mL de Triclosán.

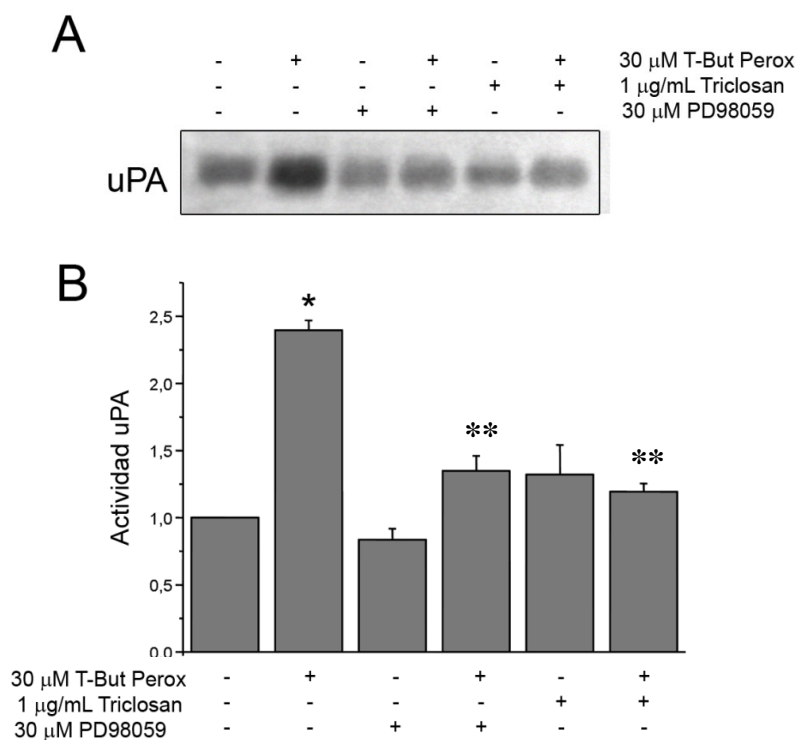


Figura 18. La actividad de uPA estimulada por H₂O₂ exógeno es dependiente de la vía MEK-1/ERK-1/2.

FGH fueron expuestos, o no, a 30 μ M de PD98059 y 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora antes de la estimulación con 30 μ M de t-BOOH. Después de 48 horas se evaluó la actividad de uPA (zimografía de caseína) en los medios condicionados (**A**). Se realizó el análisis cuantitativo de las bandas de degradación de caseína derivadas de la zimografía. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control y el doble asterisco (**) contra la condición estimulada con 30 μ M de t-BOOH (**B y D**). $p < 0,05$ $n=3$.

Para comprobar si las condiciones experimentales que promueven la expresión de uPA se correlacionaban con la activación de la vía ERK, FGH privados de SFB fueron estimulados con 30 μM de t-BOOH y se evaluó la activación de la ruta antes mencionadas a través de Western-blot de los lisados celulares a diferentes tiempos. Como se puede apreciar en la Figura 19A, la estimulación de las células con 30 μM de t-BOOH fue capaz de estimular la fosforilación de ERK-1/2 siguiendo un patrón bimodal. Se observó un aumento consistente en la fosforilación de ERK-1/2 a los 15 minutos de estímulo, seguido por el punto más alto a los 30 minutos, y luego niveles altos y significativos en la relación p-ERK/ERK a los 60 y 180 minutos.

Para identificar si Triclosán era capaz de modificar la activación/fosforilación de ERK-1/2, se obtuvieron FGH privados de SFB y fueron expuestos a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Triclosán por 1 hora. Luego fueron estimulados con 30 μM de t-BOOH a diferentes tiempos. Como se demuestra en la figura 19B, observamos una disminución en la fosforilación de ERK-1/2 a lo largo de todos los tiempos experimentales evaluados. Estos datos sugieren la participación activa de la ruta ERK-1/2 en la producción de uPA estimulada con 30 μM de t-BOOH y que Triclosán puede afectar la activación de esta ruta de señalización estimulada por H_2O_2 .

El análisis densitométrico (Figura 19C) de al menos tres experimentos independientes demostró que tanto el aumento en la fosforilación de ERK-1/2 con respecto a ERK total por t-BOOH, como la inhibición por Triclosán, alcanzaron niveles estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

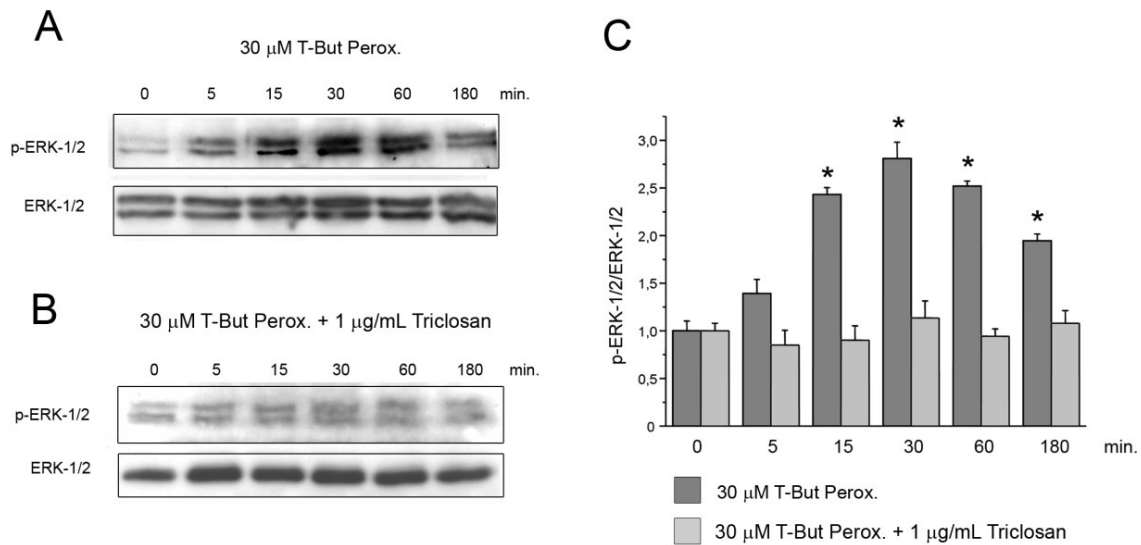


Figura 19. Triclosán inhibe la fosforilación de ERK-1/2 estimulada por H₂O₂ exógeno.

FGH fueron expuestos, o no, a 1 μ g/mL de Triclosán por 1 hora y luego estimulados con 30 μ M de t-BOOH a distintos tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 180 min.). Se evaluaron las formas fosforiladas de ERK-1/2 en los lisados celulares (**A y B**). Como control de carga, se evaluó la expresión total de ERK-1/2 (**A y B**). Después del análisis densitométrico de ERK, normalizadas con respecto a ERK total, fueron expresadas como promedios y error estándar. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedios y error estándar. (*) El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición control (**C**). $p < 0,05$ $n=3$.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que Triclosán, un agente farmacológico usado en dentífricos y colutorios bucales, puede tener un efecto no descrito previamente en la protección del tejido conectivo gingival frente a la destrucción tisular. Nuestros resultados obtenidos en cultivos primarios de fibroblastos gingivales demuestran que TNF- α , citoquina cuya actividad ha sido asociada a efectos proinflamatorios, estimula la producción de uPA, una serin-proteasa que convierte al zimógeno plasminógeno en la serin-proteasa activa plasmina. En presencia de Triclosán, la producción de uPA y la generación de plasmina fueron efectivamente inhibidas. Además, nuestros resultados muestran que Triclosán es capaz de controlar la expresión de uPA al inhibir la activación de JNK y prevenir la expresión del factor de transcripción río abajo c-Jun.

Se han encontrado cantidades significativas de TNF- α en tejidos gingivales inflamados y también en el fluido crevicular²⁰⁻²². De esta manera, es probable que niveles aumentados de esta citoquina, como los encontrados en estudios previos en lesiones periodontales, podrían estimular a fibroblastos gingivales para producir uPA. Este estudio es el primero en mostrar que cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos responden a TNF- α induciendo un aumento en la producción de uPA y la consecuente conversión de plasminógeno en plasmina. La producción de uPA estimulada con TNF- α fue bloqueada por los inhibidores de NF κ B (SN50) y JNK (SP600125). PD98059, el inhibidor de MEK-1, no produjo un bloqueo significativo en la actividad de uPA.

En concordancia con estos resultados, también encontramos que TNF- α es capaz de estimular la activación de NF κ B y JNK, sin embargo su efecto sobre la fosforilación de ERK-1/2 fue menor. En concordancia con esto, se ha descrito que TNF- α es un activador preferente de JNK en comparación a ERK⁸⁶. Estudios previos han indicado además que TNF- α puede activar las rutas de NF κ B y JNK en diversos tipos celulares, y estas cascadas han sido también asociadas a enfermedades inflamatorias^{87,88}.

Considerando estos resultados, nuestros esfuerzos se concentraron en analizar el rol de Triclosán como una molécula que afecta las rutas NF κ B y JNK, vías de señalización que se encuentran bajo una comunicación cruzada activa⁸⁹. Nuestros resultados muestran que Triclosán fue incapaz de alterar la translocación NF κ B-dependiente de la subunidad p65 al núcleo, un evento clave en la activación de los genes regulados por NF κ B⁹⁰. Este resultado es consistente con un estudio previo que mostraba que Triclosán era incapaz de modificar la activación de NF κ B en fibroblastos gingivales humanos a concentraciones similares⁹¹. Sin embargo, también se ha demostrado que la combinación de Triclosán con el detergente catiónico Cloruro de Cetilpiridinio, es capaz de inactivar la fosforilación de NF κ B⁹¹. No disponemos de información suficiente para explicar esta diferencia y pensamos que se requieren más estudios para poder definir las condiciones experimentales necesarias que permitan una inhibición de NF κ B en células pretratadas con Triclosán.

Una observación importante de nuestro trabajo fue que Triclosán inhibe la fosforilación de JNK2 y la producción del factor de transcripción c-Jun. La vía JNK ha sido relacionada con la expresión de uPA estimulada por diversos factores de crecimiento, citoquinas y agentes inductores de stress celular como luz UV⁹². Debido a que la expresión del factor de transcripción c-Jun es altamente dependiente de la actividad de la ruta JNK, este puede representar un punto final relevante de la actividad de esta vía y por ende un blanco farmacológico promisorio para intervenciones terapéuticas⁹³. Nuestro estudio es el primero en reportar que la ruta JNK puede ser inhibida por Triclosán. Se necesitan estudios posteriores adicionales para identificar otros genes regulados por JNK que podrían estar controlados por este agente farmacológico.

En cuanto al rol de los ROS en la activación de uPA, nuestras evidencias demostraron que la actividad y producción de uPA es dependiente del estado redox intracelular, debido a que el antioxidante NAC fue capaz de revertir el aumento estímulo de TNF- α . Además, logramos identificar a la enzima NAD(P)H oxidasa como una de las responsables en la activación de uPA por TNF- α , lo que indica que la producción intracelular del radical superóxido es importante para el aumento en la actividad de uPA, ya sea actuando como segundo mensajero, o transformándose en H₂O₂. Para evaluar si la producción extracelular de H₂O₂ estimulada por TNF- α tenía alguna implicancia en la actividad de uPA, las células fueron incubadas con catalasa, enzima que permanece en el medio extracelular. Estos experimentos demostraron que la actividad de uPA estimulada por TNF- α es dependiente de la producción de

H₂O₂, que podría estimular de forma autocrina a la célula aumentando la producción de uPA. Considerando estos resultados se evaluó posteriormente la actividad y producción de uPA luego de la aplicación exógena de H₂O₂, encontrando que ambos son inducidos significativamente. Este estudio es el primero que relaciona a este estímulo con el aumento en la producción y actividad de uPA en este modelo celular, e implicaría que el mecanismo de producción de uPA por TNF- α es complejo y puede estar regulado por múltiples vías.

Se ha visto también que Triclosán posee la capacidad de transformarse oxidativamente por óxidos de manganeso⁹⁴, y que esto le entrega una capacidad comparable de oxidarse en comparación a otras moléculas de carácter fenólico similar. El efecto celular derivado de la oxidación de Triclosán es, hasta ahora, desconocido. Triclosán tendría la capacidad de inhibir la producción intracelular de H₂O₂ inducida por TNF- α , actuando como una molécula antioxidante a un nivel intracelular. JNK jugaría también un rol importante en la producción de ROS intracelulares ya que al incubarse con el inhibidor específico de esta vía, SP600125, disminuyen los niveles de producción de estos. Además, Triclosán tendría la capacidad de inhibir el aumento en la producción y actividad de uPA estimuladas por H₂O₂ lo que posee altas implicancias en el control de la enfermedad periodontal debido a la importancia de los ROS en esta patología.

Por último, logramos identificar que H₂O₂ participa como un activador de la vía de transducción de señales MEK-1/ERK-1/2, y que Triclosán funciona como un agente que inhibe esta activación significativamente en todos los tiempos evaluados.

Triclosán tendría entonces diversos mecanismos, tanto en el funcionamiento subcelular, como también funcionando como un antioxidante intracelular, lo que en conjunto previene el aumento en la actividad y producción de uPA (Figura 20).

Colectivamente, nuestros datos demuestran por primera vez que Triclosán inhibe significativamente la actividad y expresión de uPA estimulada por TNF- α y H₂O₂ mediante la inhibición de la activación de las vías de señalización intracelular JNK y ERK-1/2, además de disminuir los niveles de ROS intracelulares en FGH, validando de esta forma la hipótesis propuesta. En base a los resultados se propone el siguiente modelo para la acción de Triclosán en FGH estimulados por TNF- α y H₂O₂ (Figura 20)

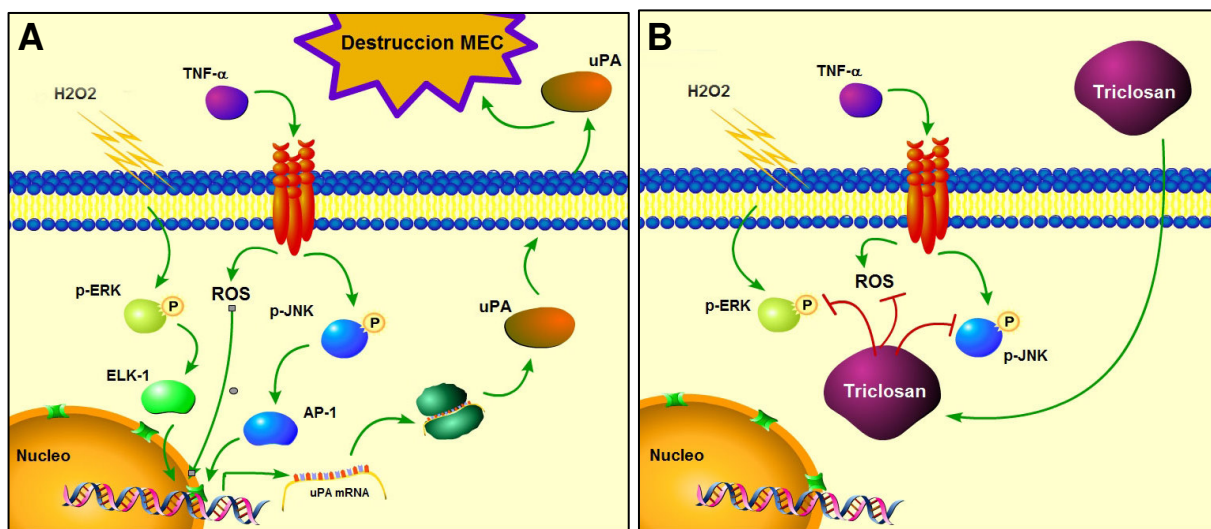


Figura 20. Modelo propuesto para la acción de Triclosán en FGH.

La inhibición de la expresión de uPA en FGH, estimulada tanto por TNF- α como por t-BOOH, involucraría la disminución en la fosforilación de JNK (y la consecuente disminución del factor de transcripción c-Jun/AP-1 y el RNAm de uPA), la disminución en la fosforilación de ERK-1/2, y la inhibición en la producción de ROS intracelulares que participarían como segundos mensajeros en la inducción de la expresión de uPA (A). Estos efectos corresponden a una vía independiente de la función antibacteriana clásica de Triclosán pero podrían explicar también en parte el efecto antiinflamatorio antes descrito en este tipo celular (B).

Lo anterior permite posicionar a esta molécula como un excelente candidato farmacológico para prevenir el avance de la enfermedad periodontal y destrucción tisular mediada por proteasas de matriz extracelular bajo la regulación de uPA.

Se postulan entonces dos nuevas rutas mediante el cual Triclosán estaría retrasando el progreso de la enfermedad periodontal. La primera sería mediante la disminución de la activación de MMPs por uPA, interfiriendo el sistema de transducción de señales para la generación de uPA y la segunda sería mediante un efecto antioxidante directo o indirecto, además de intervenir en la vía de señalización inducida por los ROS exógenos.

La progresión de la enfermedad periodontal ha sido explicada en parte por diversos factores incluyendo variaciones en los niveles de citoquinas proinflamatorias, un balance alterado entre enzimas proteolíticas y sus inhibidores, un aumento en la cantidad de ROS y cambios en la microflora subgingival entre otras⁹⁵. El uso prolongado de dentífricos que contienen Triclosán en su composición puede reducir la pérdida de piezas dentales en adolescentes y disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad periodontal en adultos⁹⁶⁻⁹⁸. Estos resultados han sido explicados en parte por la observación de que individuos que utilizan pastas dentales que contienen Triclosán mostraron reducciones en los niveles de patógenos periodontales en sitios subgingivales⁹⁹.

El fenómeno de producción de especies radicalarias por citoquinas proinflamatorias puede formar una parte principal en la generación de la enfermedad periodontal. Si Triclosán modula la formación de estas especies reactivas, se propone que Triclosán posee múltiples funciones involucradas en el control de la

enfermedad periodontal: efecto antibacteriano, efecto antiinflamatorio, efecto en la modulación de la remodelación tisular y por último una actividad antioxidante intracelular.

Debido a que la progresión de la enfermedad periodontal ha sido también asociada con un aumento en la remodelación de la matriz extracelular, los resultados del presente estudio pueden ofrecer una explicación adicional para el efecto de Triclosán en la destrucción del tejido periodontal. A pesar de que los resultados acá mostrados fueron obtenidos a partir de un modelo celular *in vitro*, sugieren que Triclosán puede regular la producción y actividad de uPA en células de tejido conectivo gingival humano. Se necesitan estudios adicionales para analizar el efecto de Triclosán en el sistema de activación de plasminógeno a un nivel clínico.

Es necesario evaluar, en un futuro, el efecto de Triclosán sobre moléculas de la matriz extracelular y otras moléculas río abajo del efecto celular, además de proteasas diferentes involucradas en la patología.

8. CONCLUSIONES

- Triclosán inhibe la actividad y expresión (RNAm y proteína) de uPA, además de la activación de plasmina estimulada por TNF- α en FGH.
- NF-kB está involucrado en la producción de uPA estimulada por TNF- α , pero no es afectado por Triclosán.
- La inhibición de la ruta JNK interfiere en la producción de uPA y Triclosán altera la fosforilación de JNK y la producción de c-Jun/AP-1 estimulada por TNF- α .
- La actividad y expresión de uPA estimulada por TNF- α depende del estado redox intracelular, la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la cantidad de H₂O₂ extracelular.
- TNF- α estimula la producción intracelular de H₂O₂ que es dependiente de la actividad de NAD(P) oxidasa, la vía JNK y el estado redox intracelular, además de ser inhibida por Triclosán.
- Triclosán inhibe la actividad y expresión de uPA, que es dependiente de la vía ERK-1/2, al inhibir la fosforilación de ERK-1/2 estimulada por H₂O₂.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Nicolau B, Thomson WM, Steele JG, Allison PJ. Life-course epidemiology: concepts and theoretical models and its relevance to chronic oral conditions. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007 Aug;35(4):241-9.
2. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9-11.
3. Gamonal JA, Lopez NI, Aranda W. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int J Dent* 1998; 48: 96-103.
4. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology* 2000 2000; 24:28-55.
5. Gooch BF, Griffin SO, Malvitz DM. The role of evidence in formulating public health programs to prevent oral disease and promote oral health in the United States. *J Evid Based Dent Pract* 2006;6: 85-89.
6. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 11: 821-878.
7. Kinane DF, Bartold PM. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontology* 2000 2007; 43: 278-293.
8. Role of protein kinase C in tumor necrosis factor induction of endothelial cell urokinase-type plasminogen activator. *Blood.* 1993 May 15;81(10):2608-17.
9. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, Last KS. Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontology* 2000, 2000; 24: 193-214.
10. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1592-600.
11. Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM. Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol.* 1993 Aug;64(8 Suppl):819-27.
12. Scully DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 2002;61(1):137-43.
13. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000;6(3):136-7.
14. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004;31(7):515-521.
15. Tanaka F., Ogura N., Abiko Y. Stimulation of plasminogen activator/plasmin system in gingival fibroblast cells by oxygen radicals. *Arch Oral Biol.* 1997 Apr;42(4):263-70.
16. Smith P., Martinez J. Epidermal growth factor stimulates urokinase-type plasminogen activator expression in human gingival fibroblasts. Possible modulation by genistein and curcumin. *J Periodontal Res.* 2004 Dec;39(6):380-7.
17. Ogura N, Tobe M, Tamaki H, Nagura H, Abiko Y. IL-1beta increases uPA and uPA receptor expression in human gingival fibroblasts. *IUBMB Life.* 2001 Jun;51(6):381-5.

18. Wang X.-J., Magara T., Konishi T. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor alpha. *Biochem J.* 1989 Oct 15;263(2):539-45. *Free Rad. Res.*, 31, 449—455 (1999).
19. Cubellis, M.V., et al. *The EMBO Journal*, 1990. 9(4): p. 1079-1085.
20. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. TNF- α in gingival crevicular fluid as a possible disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990;35:431-434.
21. Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res* 1997;76:1833-1839.
22. Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid level of Interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, and tumor necrosis factor alpha in experimental gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1993;28:241-247.
23. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differ* 2003;10:45-65.
24. Scully DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 2002;61(1):137-43.
25. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000;6(3):136-7.
26. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004;31(7):515-521.
27. Radeke HH, Meier B, Topley N, Flöge J, Habermehl GG, Resch K. Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int.* 1990 Feb;37(2):767-75. Review.
28. Liu R, Buettner GR, Oberley LW. Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha. *Free Radic Biol Med.* 2000 Apr 15;28(8):1197-205.
29. Cáceres M, Tobar N, Guerrero J, Smith PC, Martínez J. c-jun-NH2JNK mediates invasive potential and EGFR activation by regulating the expression of HB-EGF in a urokinase-stimulated pathway. *J Cell Biochem* 2008;103:986-993.
30. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-35, 1995.
31. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res.* 2000 Oct;79(10):1789-93.
32. Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *AJTC Am J Infect Control* 1996;24:209-18.
33. Ciha-Geigy Corporation. Irgasan7DP300: Broad Spectrum Antimicrobial. High Point (NC): Ciha-Geigy Corporation; April, 1995.
34. DeSalva SJ, Kong BM, Lin YJ. Triclosan: a safety profile. *Am J Dentistry* 1989;2:185-96.
35. Jones, R. D., Jampani, H. B., Neman, J. L. et al. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control* 28, 184—96.
36. Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* 202, 1—7.

37. McLeod, R., Muench, S. P., Rafferty, J. B. et al. (2001). Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan FabI. *International Journal of Parasitology* 31,109–13.
38. S. Ciba-Geigy. (1988). Document: Irgasan DP 300. Ciba, Wyhlen, Germany.
39. Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI, et al (2006). "Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities". *J. Hosp. Infect.* 63 Suppl 1: S1–44.
40. B Brady LM, Thomson M, Palmer MA, Harkness JL (1990). "Successful control of endemic MRSA in a cardiothoracic surgical unit". *Med. J. Aust.* 152 (5): 240–5.
41. Zafar AB, Butler RC, Reese DJ, Gaydos LA, Mennonna PA (1995). "Use of 0.3% triclosan (Bacti-Stat) to eradicate an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal nursery". *American journal of infection control* 23 (3): 200–8.
42. Food and Drug Administration. OTC topical antimicrobial products and drug and cosmetic products proposed rules. 39 Federal Register 33102-33141 (September 6. 1974).
43. Food and Drug Administration. Topical antimicrobial products tentative final monograph. 43 Federal Register 1210-1249, (January 6. 1978).
44. Food and Drug Administration. Tentative final monograph for health-care antiseptic drug products; proposed rule. 59 Federal Register 31402-31451 (June 17. 1994).
45. Food and Drug Administration. FDA approves first toothpaste for gum disease. FDA Talk Paper 1997 July 14.
46. Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 750–63.
47. McMurry, L. M., Oethinger, M. & Levy, S. B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531–2.
48. Levy, C. W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S. et al. (1999). Molecular basis of triclosan activity. *Nature* 398, 383–4.
49. Heath, R. J. & Rock, C. O. (2000). A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* 406, 145–6.
50. Stephen KW, Saxton CA, Jones CL, Ritchie JA, Morrison T. Control of gingivitis and calculus by a dentifrice containing a zinc salt and triclosan. *J Periodontol* 1990;61:674–679.
51. Lindhe J, Rosling B, Socransky SS, Volpe AR. The effect of triclosan containing dentifrice on established plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:327–334.
52. Ellingsen JE, Rølla G. Dental plaque inhibition by a combination of triclosan and polydimethylsiloxane (silicone oil). *Scand J Dent Res* 1994;102:26–29.
53. Kanchanakamol U, Umpriwa R, Jotikasthira N, Srisilapanan P, Tuongratanaphan S, Sholitkul W, Chat-Uthai T. Reduction of plaque formation and gingivitis by a dentifrice containing triclosan and copolymer. *J Periodontol* 1995;66:109-112.
54. Niederman R. Triclosan-containing toothpastes reduce plaque and gingivitis. *Evid Based Dent* 2005;6:33.
55. Müller HP, Barrieshi-Nusair KM, Könönen E, Yang M. Effect of triclosan/copolymer-containing toothpaste on the association between plaque and gingival bleeding: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2003;33:811-818.

56. Ellwood RP, Worthington HV, Blinkhorn AS, Volpe AR, Davies RM. Effect of a triclosan/copolymer dentifrice on the incidence of periodontal attachment loss in adolescents. *J Clin Periodontol* 1998;25:363-367.
57. Rosling B, Dahlén G, Volpe A, Furuichi Y, Ramberg P, Lindhe J. Effect of triclosan on the subgingival microbiota of periodontitis-susceptible subjects. *J Clin Periodontol* 1997;24:881-887.
58. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ. The effect of a triclosan-containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. *J Clin Periodontol* 2003;30:414-419.
59. Mustafa M, Wondimu B, Yucel-Lindberg T, Kats A-Hallström T, Jonsson AS, Modéer T. Triclosan reduces microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2005;32:6-11.
60. Rosling B, Wannfors B, Volpe AR, Furuichi Y, Ramberg P, Lindhe J. The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1997;24:873-880.
61. Lin YJ, Fung KK, Kong BM, De Salva SJ. 1994. Gingival absorption of triclosan following topical mouthrinse application. *Am J Dent* 7:13-16.
62. Lin YJ. 2000. Bucal absorption of triclosan following topical mouthrinse application. *Am J Dent* 13:215-217.
63. Bagley DM, Lin YJ. 2000. Clinical evidence for the lack of triclosan accumulation from daily use in dentifrices. *Am J Dent* 13:148-152.
64. Mustafa M, Wondimu B, Hulthenby K, Yucel-Lindberg T, Modéer T. Uptake, distribution and release of ¹⁴C-triclosan in human gingival fibroblasts. *J Pharm Sci.* 2003 Aug;92(8):1648-53.
65. Skaare A, Eide G, Herlofson B, Barkvoll P, Rølla G. The effect of toothpaste containing triclosan on oral mucosal desquamation. *J Clin Periodontol* 1996;23:1100-1103.
66. Barkvoll P, Rølla G. Triclosan protects the skin against dermatitis caused by sodium lauryl sulphate exposure. *J Clin Periodontol* 1994;21: 717-719.
67. Gaffar A, Scherl D, Afflitto J, Coleman EJ. The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1995;22:480-484.
68. Modéer T, Bengtsson A, Rølla G. Triclosan reduces prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 in vitro. *J Clin Periodontol* 1996;23:927-933.
69. Dewhirst FE, Moss DE, Offenbacher S, Goodson JM. Levels of prostaglandin E2, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. *J Periodontal Res* 1983; 182: 156-163.
70. Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* 1986; 212: 101-112.
71. Offenbacher S, Odle BM, Green MD, et al. Inhibition of human periodontal prostaglandin E2 synthesis with selected agents. *Agents Actions* 1990; 293: 232-238.
72. Gaffar A, Nabi N, Olsen S. Antiplaque effects of dentifrices containing triclosan/copolymer/Naf systems versus triclosan dentifrices without the copolymer. *American Journal of dentistry.* 3, s7-s14. 1995.
73. Mustafa M, Wondimu B, Ibrahim M, Modéer T. 1998. Effect of triclosan on interleukin-1b production in human gingival fibroblasts challenged with tumor necrosis factor a. *Eur J Oral Sci* 106:637-643.

74. Mustafa M, Bakhiet M, Wondimu B, Mode'er T. 2000. Effect of triclosan on interferon-g production and major histocompatibility complex class II in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 27:733–737.
75. Tanaka F., Ogura N., Abiko Y. Stimulation of plasminogen activator/plasmin system in gingival fibroblast cells by oxygen radicals. *Arch Oral Biol.* 1997 Apr;42(4):263-70.
76. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000;6(3):136-7.
77. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000 2000;24:28-55.
78. Larjava H, Heino J, Kähäri VM, Krusius T, Vuorio E. Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. *J Dent Res.* 1989 Jan;68(1):20-5.
79. Santibañez JF, Maccioni RB, Martínez J. The secretion of urokinase-like plasminogen activator is inhibited by microtubule-interacting drugs. *Cell Biochem Function* 1995;13:217-225.
80. Sliva D, Rizzo MT, English D. Phosphatidylinositol 3-Kinase and NFκB Regulate Motility of Invasive MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells by the Secretion of Urokinase-type Plasminogen Activator. *J Biol Chem* 2002;277:3150–3157.
81. Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995;270:14255-14258.
82. Curtin JF, Cotter TG. (2004) JNK regulates HIPK3 expression and promotes resistance to Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:17090-17100.
83. Fu Y, Zheng S, Lu SC, Chen A. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis. *Mol Pharmacol.* 2008 May;73(5):1465-73. Epub 2008 Jan 29.
84. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydrogenperoxide using a fluorescent dichlorofl uorescein assay. *Anal Biochem* 1983; 134:111-116.
85. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'- dichlorofl uorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 227-231.
86. Westwick JK, Weitzel C, Mindenn A, Karinn M, Brenner DA. Tumor Necrosis Factor-α stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun Kinase. *J Biol Chem* 1994;269:26396-26401.
87. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Increase of CCL20 expression by human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial endotoxin. *Clin Exp Immunol* 2005;142:285-91.
88. Han Z, Boyle, DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001;108:73-81.
89. Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D, Zhou W, Engelhardt JF. κBα and IκBβ possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-κB induction and inflammation. *J Clin Invest* 2004;113:746-755.
90. Karin M. Nuclear factor-κB in cancer development and progression. *Nature* 2005;441:431-436.

91. Kim YJ, Rossa CJr, Kirkwood KL. Prostaglandin production by human gingival fibroblasts inhibited by triclosan in the presence of cetylpyridinium chloride. *J Periodontol* 2005;76:1735-1742.
92. Cáceres M, Tobar N, Guerrero J, Smith PC, Martínez J. c-jun-NH2JNK mediates invasive potential and EGFR activation by regulating the expression of HB-EGF in a urokinase-stimulated pathway. *J Cell Biochem* 2008;103:986-993.
93. Efer R, Wagner EF. AP-1: A double-edge sword in tumorigenesis: *Nat Rev Cancer* 2003;3: 859-867.
94. Zhang H, Huang CH. Oxidative transformation of triclosan and chlorophene by manganese oxides. *Environ Sci Technol.* 2003 Jun 1;37(11):2421-30.
95. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:196-209.
96. Ellwood RP, Worthington HV, Blinkhorn AS, Volpe AR, Davies RM. Effect of a triclosan/copolymer dentifrice on the incidence of periodontal attachment loss in adolescents. *J Clin Periodontol* 1998;25:363-367.
97. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ. The effect of a triclosan-containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. *J Clin Periodontol* 2003;30:414-419.
98. Rosling B, Wannfors B, Volpe AR, Furuichi Y, Ramberg P, Lindhe J. The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1997;24:873-880.
99. Rosling B, Dahlén G, Volpe A, Furuichi Y, Ramberg P, Lindhe J. Effect of triclosan on the subgingival microbiota of periodontitis-susceptible subjects. *J Clin Periodont* 1997;24:881-887.

10. Anexos

Trabajos enviados a congresos y publicaciones generadas de esta Tesis:

10.1. Presentaciones a congresos/premios obtenidos:

- 2008 **Arancibia R.** XXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón 2008, **1^{er} lugar en categoría Trabajos Pregrado.** Premio Hyclone –GenExpress.
- 2008 **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J y Smith PC. XXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón 2008, “Triclosán inhibe la producción de uPA y de especies reactivas de oxígeno en fibroblastos gingivales humanos”.
- 2008 **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J y Smith PC. XXI Reunión Anual Internacional Association for Dental Research (IADR 2008), Talca, Facultad de Odontología, Universidad de Talca. Presentación Oral: “Triclosán y su función antioxidante en fibroblastos gingivales humanos”.
- 2008 **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J y Smith PC. XXI Reunión Anual Internacional Association for Dental Research (IADR 2008), Talca, Facultad de Odontología, Universidad de Talca. Poster: “Triclosán y su función antioxidante en fibroblastos gingivales humanos”.
- 2007 **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J y Smith PC. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón, 2007, “Triclosán inhibe la producción de uPA estimulada por TNF- α en fibroblastos gingivales humanos”.
- 2007 **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J y Smith PC. XX Reunión Anual Internacional Association for Dental Research (IADR), Santiago, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. “Efecto de Triclosán sobre la producción de Uroquinasa en fibroblastos gingivales humanos” .
- 2007 González R, **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J, Smith PC*. Humo de cigarrillo estimula la producción de uroquinasa en fibroblastos-gingivales XX Reunión IADR división Chile, Santiago, 8 -10 Octubre de 2007.
- 2006 **Arancibia R,** Cáceres M, Martínez J, González R. y Smith PC. XIX Reunión Anual Internacional Association for Dental Research (IADR), Valparaíso, Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso, en calidad de 1° Autor de presentación oral: “Triclosán inhibe la producción de uroquinasa estimulada por TNF- α en fibroblastos gingivales humanos”.
- 2006 González R, **Arancibia R,** Cáceres M, Guerrero J, Martínez J, Smith PC*. Condensado de humo de cigarrillo estimula la producción de uroquinasa (uPa) a través de las vías ERK y JNK en fibroblastos gingivales humanos. XX Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Chile, Pucón. Octubre de 2006.

10.2. Publicaciones:

- Smith PC, González R, **Arancibia R,** Cáceres M, Guerrero J, Martínez J. *Cigarette smoke condensate stimulates Urokinase production through the generation of reactive oxygen species and activation of ERK / JNK pathways in*

human gingival fibroblasts. Journal of Periodontal Research, (aceptado, en prensa) 2008.

- **Arancibia R, Cáceres M, Martínez J, Smith PC.** *Triclosan inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated urokinase production in human gingival fibroblasts*. Journal of Periodontal Research, (aceptado, en prensa) 2008 (abstract en 10.3)

10.3. Abstract

<p><small>J Periodont Res 2008 All rights reserved</small></p> <h2 style="text-align: center;">Triclosan inhibits tumor necrosis factor-α-stimulated urokinase production in human gingival fibroblasts</h2> <p><small>Arancibia R, Cáceres M, Martínez J, Smith PC. Triclosan inhibits tumor necrosis factor-α-stimulated urokinase production in human gingival fibroblasts. J Periodont Res 2008; 00: 000-000. © 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 Blackwell Munksgaard</small></p> <p>Background and Objectives: Destruction of the supporting periodontal tissues is mediated by the action of several proteolytic enzymes. Urokinase is a serine protease that plays a key role in connective tissue destruction through conversion of plasminogen into plasmin. The present study was conducted to evaluate the effect of triclosan on the production and activity of urokinase in cultured gingival fibroblasts.</p> <p>Material and Methods: Urokinase production was studied in primary cultures of human gingival fibroblasts stimulated with tumor necrosis factor-α. Urokinase activity and production were evaluated using casein zymography and western blotting, respectively. Urokinase mRNA expression was evaluated using the reverse transcription-polymerase chain reaction. Triclosan was used to interfere with this stimulatory effect. The roles of different cell-signaling cascades involved in urokinase production were assessed through western blotting and immunofluorescence using several cell-signaling inhibitors.</p> <p>Results: Tumor necrosis factor-α was found to be a strong stimulus for urokinase production and triclosan was able to inhibit this response at the protein and mRNA levels. Triclosan was also able to inhibit conversion of plasminogen into plasmin. Tumor necrosis factor-α-stimulated urokinase production was shown to be dependent on the nuclear factor-κB and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. Triclosan inhibited c-Jun N-terminal kinase phosphorylation and c-Jun production.</p> <p>Conclusions: Within the limits of this study, these results show that triclosan may inhibit urokinase production and plasminogen activation in gingival fibroblasts through modulation of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway.</p>	<p style="text-align: center;"><small>© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 Blackwell Munksgaard</small></p> <p style="text-align: center;">JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01184.x</p> <p>R. Arancibia¹, M. Cáceres², J. Martínez², P. C. Smith¹</p> <p><small>¹Laboratory of Periodontal Physiology, Dentistry Academic Unit, School of Medicine, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago and ²Laboratory of Cell Biology INTA, Universidad de Chile, Santiago, Chile</small></p> <p>Patricio C. Smith, Laboratory of Periodontal Physiology, Dentistry Academic Unit, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Marcoleta 391, Santiago, Chile Tel: +56 2 354 3408 Fax: +XX XXX XXXX e-mail: psmith@med.puc.cl</p> <p>Key words: Triclosan; fibroblast; urokinase; gingival</p> <p>Accepted for publication Xxxx XX, 200x</p>
--	---