



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

# “Efectos del condensado de humo de cigarrillo y nicotina sobre la migración y diferenciación miofibroblástica en fibroblastos gingivales humanos”

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

## Daniel Ignacio Silva Vargas

**Director**

**Dr. Patricio Smith Ferrer**

Laboratorio de Fisiología Periodontal  
Centro de Investigaciones Médicas (CIM)  
Carrera de Odontología  
Facultad de Medicina  
Pontificia Universidad Católica de Chile

**Patrocinante**

**Dra. Daniela Seelenfreund**

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

**Santiago de Chile, 2010**

*Esta tesis fue financiada completamente por:*

*Proyecto FONDECYT #1090142*

***Esta tesis dio lugar a las siguientes presentaciones en congresos***

- **Silva D**, Cáceres M, Arancibia R, Martínez C, Smith PC. XXIV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón 2010. *“Effects of cigarette smoke on cell migration and myofibroblastic differentiation”*.
- **Silva D**, Cáceres M, Arancibia R, Martínez C, Smith PC. XXIII Reunión Anual International Association for Dental Research (IADR 2010), Valdivia, Escuela de Odontología, Universidad Austral de Chile. *“Effects of cigarette smoke on cell migration and myofibroblastic differentiation”*.

*Esta tesis fue seleccionada como ganadora del premio Hatton 2011 en la XXIII Reunión Anual de la International Association for Dental Research, para representar a División Chile en la Reunión Internacional de la IADR, a realizarse en San Diego, California, en Marzo de 2011.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero agradecer al Dr. Patricio Smith por la experiencia brindada, los buenos momentos vividos, la dedicación y voluntad para desarrollar este trabajo. No puedo dejar de agradecer a mis compañeros de laboratorio: Mónica Cáceres y Rodrigo Arancibia, por sus consejos y apoyo en los momentos más difíciles, y por hacer de mi estadía en el laboratorio de Fisiología Periodontal un momento inolvidable.*

*Me gustaría agradecer a agradecer a mi familia, María Teresa, Iván y Sebastián por su constante preocupación y cariño durante el desarrollo de este trabajo, y a Karin y Patricio por su disposición y ayuda para presentar este trabajo en importantes congresos.*

*Finalmente, quiero agradecer a Cristina Acuña por su incondicional apoyo y por ser el sustento de mi confianza en desarrollo de esta tesis.*

*Sin ustedes, nada de esto habría sido posible.*

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Enfermedad Periodontal.....	1
1.1.1 <i>Patogénesis de la Enfermedad Periodontal</i> .....	1
1.1.2 <i>Especies Reactivas de Oxígeno</i> .....	2
1.2 Reparación Tisular. ....	3
1.3 Efectos del tabaquismo sobre la enfermedad periodontal y reparación tisular en el periodonto.....	5
1.3.1 <i>Estudios celulares en el ámbito del efecto de CHC y nicotina sobre migración y diferenciación miobroblástica</i> .....	6
1.4 Planteamiento del problema. ....	7
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	9
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	9
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	9
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
5.1 Instrumentos y equipos.....	10
5.2 Cultivo celular.....	10
5.3 Crio-preservación de FGH. ....	12
5.4 Análisis de la viabilidad celular de FGH mediante el ensayo de MTS.....	12
5.5 Migración en cierre de heridas. ....	13
5.6 Migración celular en nidos de colágeno.....	13
5.7 Migración celular en sistema bicameral (Transwell). ....	14
5.8 Inmunoblot. ....	14
<b>6. RESULTADOS</b> .....	17
6.1 Definición de las concentraciones de uso de CHC y nicotina. ....	17
6.2 Efectos del CHC y nicotina sobre la viabilidad celular en FGH.....	17
6.3 Efectos del CHC y nicotina sobre la migración celular.....	19
6.4 Migración en cierre de heridas en monocapa. ....	21

6.5 Migración en nidos. ....	23
6.6 Migración en sistema bicameral (invasión). ....	26
6.7 Efectos del CHC sobre la diferenciación miofibroblástica.....	28
6.8 Efectos del CHC y nicotina sobre producción de $\alpha$ -SMA.....	29
<b>7. Discusión</b> .....	<b>31</b>
7.1 Definición de concentraciones de nicotina y CHC. ....	32
7.2 Efectos de nicotina y CHC sobre viabilidad celular.....	33
7.3 Efectos de nicotina y CHC sobre migración celular. ....	34
7.4 Efectos de nicotina y CHC sobre diferenciación de miofibroblastos. ....	35
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>37</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>38</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

<i>Figura 1. Migración de fibroblastos desde los márgenes de la herida hacia el coágulo y su diferenciación a miofibroblastos. ....</i>	4
<i>Figura 2. Esquema de fases de la reparación. ....</i>	4
<i>Figura 3. Explante de ligamento periodontal en cultivo. ....</i>	11
<i>Figura 4. Cultivo primario de FGH teñidos con cristal violeta.. ....</i>	11
<i>Figura 5. Reducción del compuesto tetrazolio MTS a su producto formazan. ....</i>	12
<i>Figura 6. Modelo de migración tridimensional de nidos de colágeno. ....</i>	13
<i>Figura 7. Obtención del condensado de humo de cigarrillo.....</i>	16
<i>Figura 8. Modulación de la viabilidad celular por CHC y nicotina. ....</i>	19
<i>Figura 9. Viabilidad celular a 48 horas en presencia de SFB al 1%. ....</i>	20
<i>Figura 10. Efectos del CHC y nicotina sobre la migración celular en monocapa. ....</i>	22
<i>Figura 11. Cuantificación de células en migración en monocapa.....</i>	23
<i>Figura 12. Viabilidad celular a 48 horas en presencia de SFB al 1%. ....</i>	24
<i>Figura 13. Efecto de CHC y nicotina sobre la migración celular en modelo tipo nido. ....</i>	25
<i>Figura 14. Cuantificación de células en migración en nido. . ....</i>	26
<i>Figura 15. Efecto de CHC y nicotina sobre la migración e invasión en modelo bicameral.. ....</i>	27
<i>Figura 16. Cuantificación de células en migración e invasión en sistema bicameral. ....</i>	28
<i>Figura 17. Viabilidad Celular a 72 horas.....</i>	29
<i>Figura 18. Efecto de CHC y nicotina sobre los niveles relativos de <math>\alpha</math>-SMA.....</i>	30

## ***Abreviaturas***

<b><math>\alpha</math>-MEM:</b>	Medio esencial mínimo alfa
<b><math>\alpha</math>-SMA:</b>	Actina de músculo liso tipo $\alpha$ .
<b>AA:</b>	Ácido araquidónico.
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de carbono.
<b>CHC:</b>	Condensado de humo de cigarrillo.
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA:</b>	Etilendiamintetraacetato (ácido etilendiamino tetraacético).
<b>EHC:</b>	Extracto de humo de cigarrillo.
<b>EP:</b>	Enfermedad periodontal.
<b>ERK:</b>	Quinasa de regulación extracelular.
<b>FGH:</b>	Fibroblastos gingivales humanos.
<b>FN-EDA:</b>	Fibronectina extra-dominio A.
<b>MAPK:</b>	Quinasa activada por mitógenos.
<b>MEC:</b>	Matriz extracelular.
<b>MMP:</b>	Metaloproteasa de matriz.
<b>MTS:</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolio.
<b>NADPH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

<b>NADH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido.
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino.
<b>PVDF:</b>	Fluoruro de polivinilideno.
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>SFB:</b>	Suero fetal bovino.
<b>SDS:</b>	Dodecilsulfato de sodio.
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
<b>TBS:</b>	Tampón tris salino.
<b>TGF-<math>\beta</math>1:</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1.
<b>uPA:</b>	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

## **RESUMEN**

### **Efectos del condensado de humo de cigarrillo y nicotina sobre la migración y diferenciación miofibroblástica en fibroblastos gingivales humanos.**

Si bien la exposición al humo de cigarrillo puede comprometer la capacidad de reparación de los tejidos gingivales, el papel de los elementos que componen el humo de cigarrillo ha sido, a la fecha, poco caracterizado. El presente estudio fue desarrollado con el fin de analizar el papel de la nicotina y del condensado de humo de cigarrillo (CHC) sobre la viabilidad celular, migración e invasión celular, y diferenciación miofibroblástica en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos (FGH).

Los FGH fueron estimulados con concentraciones de nicotina equivalentes a la descrita en el plasma de fumadores crónicos. A su vez, se utilizaron concentraciones de CHC proporcionales al contenido de nicotina en un cigarrillo de investigación. La viabilidad de FGH expuestos a CHC y nicotina fue evaluada mediante el ensayo de MTS. La migración celular fue analizada a través de ensayos de cierre de heridas, migración en nido y sistemas de invasión bicameral. El nivel relativo del marcador de miofibroblastos, actina muscular alfa ( $\alpha$ -SMA), fue evaluado mediante Western-blot.

A bajas concentraciones de CHC (50  $\mu$ g/mL), pero no de nicotina, los FGH experimentaron un incremento en la viabilidad celular. A mayores concentraciones de CHC (sobre 200  $\mu$ g/mL) y de nicotina, sólo el CHC indujo muerte celular. Tanto la nicotina como el CHC indujeron un estímulo sobre la migración celular (50  $\mu$ g/mL CHC; 3,2  $\mu$ g/mL nicotina), seguido por una disminución en esta respuesta sólo frente al CHC (150  $\mu$ g/mL). Tanto la nicotina como el CHC disminuyeron los niveles relativos de  $\alpha$ -SMA. El CHC puede estimular la viabilidad y migración celular a bajas concentraciones e inhibir estas respuestas a mayores niveles de exposición. Tanto la nicotina como el CHC pueden inhibir la diferenciación de miofibroblastos. Por otro lado, la nicotina no afecta la migración celular, como ha sido propuesto en estudios previos.

Los resultados de la presente tesis contribuyen a comprender los efectos del tabaquismo, y más específicamente de nicotina y de la fase particulada del humo de cigarrillo sobre la capacidad de reparación de células del tejido gingival humano.

## **ABSTRACT**

### **Effects of cigarette smoke condensate and nicotine on cell migration and myofibroblastic differentiation on human gingival fibroblasts.**

Several studies have analyzed the role of nicotine as a prominent agent affecting gingival wound repair in smokers. Besides the effect of nicotine as a pathogenic agent in smoking related diseases, tobacco smoke involves several components that may affect the wound healing properties of gingival tissues. The present study was designed to evaluate the role of nicotine and cigarette smoke condensate (CSC) on cell viability, cell migration and invasion and myofibroblastic differentiation using primary cultures of human gingival fibroblasts (HGF).

HGF were stimulated with nicotine concentrations corresponding to the levels described in the plasma of chronic smokers. Moreover, we used CSC concentrations corresponding to the relative content of nicotine in research cigarettes. Cell viability was evaluated using the MTS assay. Cell migration was assessed through scratch wound healing assays, nested collagen cell migration and cell invasion assays. The relative levels of the myofibroblast marker, smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), were evaluated through Western-blot.

At low CSC concentrations (50  $\mu$ g/mL), but not of nicotine, HGF demonstrated an increase in cell viability. At higher concentrations (200  $\mu$ g/mL and more), CSC but not nicotine induced cell death. Both nicotine and CSC induced a stimulus on cell migration followed by an inhibition (150  $\mu$ g/mL CSC) exerted only by CSC. Both nicotine and CSC diminished  $\alpha$ -SMA levels.

CSC may stimulate cell survival and migration at low concentrations and inhibit these cell responses at higher levels of exposure to tobacco smoke components. Both nicotine and CSC may alter myofibroblastic differentiation. In opposition to previous published data, nicotine does not affect cell migration. The results of this thesis contribute to a better understanding of the effects of tobacco smoking and more specifically of nicotine and CSC on wound repair related responses in human gingival fibroblasts.

## 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 e investigación (Page y Schroeder, 1976). Las necesidades de tratamiento por esta enfermedad en la población chilena son extremadamente altas, alcanzado niveles de 99 y 98% en los niveles socioeconómicos bajo y medio y 56% en el nivel alto (Gamonal y cols., 1998).

Los tejidos periodontales están conformados por la encía y los tejidos periodontales de inserción (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar) (Bartold y Narayanan, 2006). La encía corresponde a una mucosa conformada por un epitelio de revestimiento y un corion de tejido conectivo que se encuentran en constante exposición a agentes injuriantes físicos, químicos y bacterianos (Bartold y Narayanan, 2006). La infección bacteriana de la encía se traduce en una respuesta inflamatoria conocida como **gingivitis** que busca eliminar el agente agresor y reestablecer la normalidad del tejido (Bartold y cols., 2000). Esta lesión puede derivar en un proceso inflamatorio más complejo conocido como **enfermedad periodontal (EP)** o **periodontitis marginal**. La EP se caracteriza por la pérdida de las estructuras de soporte dentario, vale decir, reabsorción del hueso alveolar, destrucción de fibras colágenas del ligamento periodontal y alteraciones patológicas del cemento radicular lo que puede derivar en la pérdida de piezas dentarias (Page y Schroeder, 1976).

#### 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 primarios (Page y cols., 1997). La presencia de estas bacterias puede desencadenar una cascada de respuestas pro-inflamatorias en el hospedero. Esta lesión inflamatoria

se manifiesta además, a nivel histopatológico, por la infiltración del tejido gingival por leucocitos polimorfo nucleares neutrófilos, monocitos-macrófagos, linfocitos y plasmocitos (Page, Offenbacher, Schroeder, Seymour y Kornman, 1997). Tanto células epiteliales, infiltrantes y fibroblastos del tejido gingival participan en el mencionado proceso a través de la secreción de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas que regulan esta respuesta tisular (Bartold y Narayanan, 2006). Como respuesta a muchos de estos factores, el tejido es además activamente remodelado por acción de enzimas proteolíticas entre de las cuales se incluyen serín y metaloproteasas (Häkkinen y cols., 2000; Smith y cols., 2004a; 2004b; Pozo y cols., 2005; Silva y cols., 2008).

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, este equilibrio se ve desbalanceado, y los procesos de destrucción tisular exceden los procesos de síntesis (Hausmann y cols., 1992). Durante la enfermedad periodontal, muchas de las fibras colágenas del tejido conectivo se degradan 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), las cuales son expresadas en una amplia variedad de células *in vivo*, como también en células aisladas de tejidos conectivos sanos y enfermos (Giannobile, 2008).

#### *1.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno.*

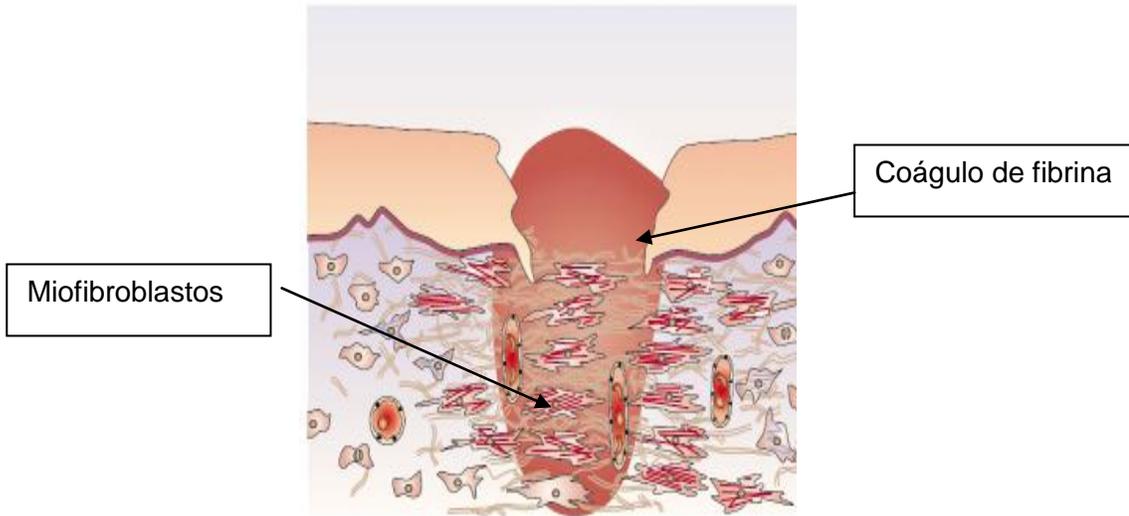
Los mecanismos asociados al surgimiento y desarrollo de la Enfermedad Periodontal están además muy relacionados con la sobreactivación de leucocitos polimorfonucleares, lo que conlleva a una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), tanto de parte de este tipo celular como también de los fibroblastos (Chapple y Matthews, 2007), 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), con la consecuente ruptura del balance redox y también la disminución de la capacidad antioxidante tisular e intracelular (Brock y cols., 2004).

## **1.2 Reparación Tisular.**

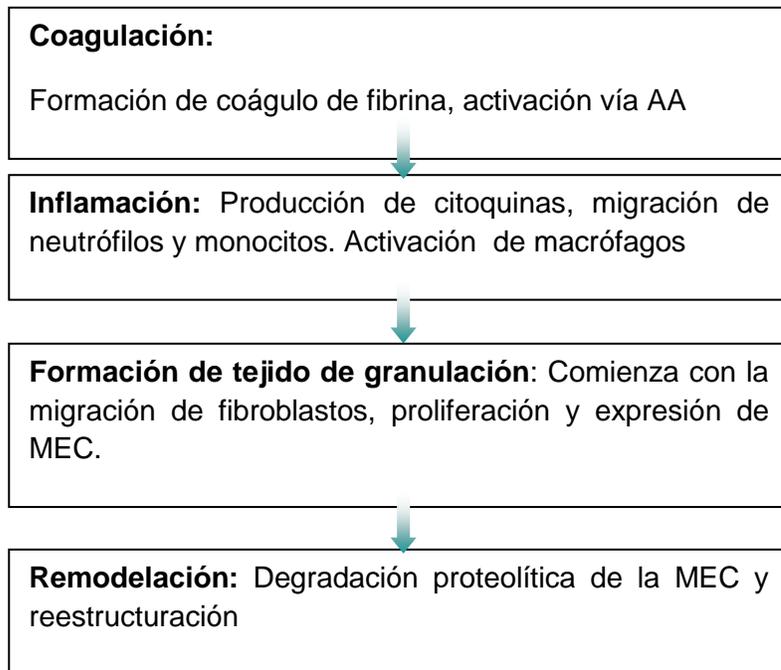
La reparación de tejidos es un proceso complejo que incluye los fenómenos de coagulación, inflamación, síntesis de matriz, angiogénesis, fibroplasia, epitelización, contracción de la herida y remodelación del tejido cicatrizal (Martin, 1997).

La reparación comienza con la formación de un coágulo de fibrina que provee una matriz provisional sobre la cual las células migran durante el proceso reparativo. Dicho coágulo consiste en una población de plaquetas inmersas en una malla de fibrina junto con pequeñas cantidades de fibronectina, vitronectina y trombospondina plasmáticas. Es importante destacar, que este coágulo sirve como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento que son liberados cuando las plaquetas desgranulan (Martin, 1997).

El proceso de reparación involucra una serie de fases que incluyen una respuesta inflamatoria, la formación de tejido de granulación y remodelación de tejido cicatrizal. La transición hacia la formación del tejido de granulación comienza con la migración de fibroblastos desde los márgenes de la herida (figura 1) y el cierre del componente epitelial a nivel superficial. Los fibroblastos se adhieren a la recién formada matriz provisional de la herida (coágulo plaquetario) y comienzan a sintetizar especies moleculares que forman el tejido de granulación (Schaffer y Nanney, 1996; Goldberg y cols., 2007). Una población especializada de células mesenquimales conocida como miofibroblastos se diferencia en esta etapa de la reparación (Martin, 1997).



*Figura 1. Migración de fibroblastos desde los márgenes de la herida hacia el coágulo y su diferenciación a miofibroblastos.*



*Figura 2. Esquema de fases de la reparación.*

Se acepta que la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto representa un evento clave durante la cicatrización y la reparación tisular. La gran fuerza contráctil generada por los miofibroblastos es beneficiosa para la fisiología de la remodelación tisular. El marcador más aceptado que caracteriza el fenotipo miofibroblástico es la inducción de la isoforma de actina  $\alpha$ -SMA (actina muscular alfa). Se ha identificado que la expresión de esta proteína permite que los miofibroblastos generen la tensión tisular requerida para la remodelación y además, incrementen la síntesis de matriz extracelular (MEC). También su mayor actividad proteolítica contribuye al remodelamiento de tejido. Los miofibroblastos contribuyen con la producción de componentes de la MEC que permiten restituir los tejidos dañados, entre los que destacan los colágenos tipo I, III, IV y V. Además, expresan una variante por splicing de fibronectina (FN-EDA) y la glicoproteína tenascina- C (Hinz, 2007).

### **1.3 Efectos del tabaquismo sobre la enfermedad periodontal y reparación tisular en el periodonto.**

Numerosos estudios clínicos han reportado que el tabaquismo puede actuar como un importante factor de riesgo para el desarrollo y progresión de la EP (Martinez-Canut y cols., 1995; Grossi y cols., 1995; Tomar y Asma, 2000; Bergström, 2003; Johnson y Guthmiller, 2007). A nivel clínico, el tabaco tiene además repercusiones negativas en la respuesta al tratamiento periodontal quirúrgico y no-quirúrgico, en procedimientos regenerativos y luego de la instalación de implantes óseointegrados (Martins y cols., 2004; Saldanha y cols., 2004; Benatti y cols., 2005; Labriola y cols., 2005; Carvalho y cols., 2006; César-Neto y cols., 2006; Strietzel y cols., 2007). Datos de la Encuesta Nacional de Salud muestran que un 42% de la población adulta chilena es fumador actual, lo que evidencia una alta prevalencia para este factor de riesgo en nuestra población (Minsal 2003).

Los efectos del tabaquismo sobre los tejidos periodontales han sido atribuidos a diferentes mecanismos que incluyen una disminución en la respuesta inmunitaria local (Graswinckel y cols., 2004), una función alterada del neutrófilo (Söder, 1999; Erdemir y cols., 2004) y un metabolismo inadecuado de los componentes de la MEC (Ryder, 2007). Los Polimorfonucleares neutrófilos provenientes de individuos fumadores

pueden liberar una cantidad aumentada de superóxido, lo que puede traer consecuencias negativas en la reparación tisular (Rahman y cols., 1996). A este hecho debemos agregar que se ha identificado que fibroblastos expuestos a nicotina experimentan una disminución del glutatión reducido (Chang y cols., 2003). El efecto sumatorio de estos factores podría generar un ambiente pro-oxidante en el tejido que favorece la destrucción tisular. Estas respuestas celulares además se extienden a alteraciones de la adhesión y migración celular, proliferación y síntesis de colágeno (Gamal y Bayomy, 2002; Tanur y cols., 2000). Sin embargo, muchos de estos estudios presentan limitaciones considerando que en su mayoría han utilizado cultivos primarios de fibroblastos gingivales o de ligamento periodontal estimulados con nicotina (Raulin y cols., 1988; James y cols., 1999; Giannopoulou y cols., 1999; Tanur, McQuade, McPherson, Al-Hashimi y Rivera-Hidalgo, 2000). Si bien la nicotina, principal factor inductor de la dependencia al hábito de fumar (Behm y cols., 1990), tiene efectos deletéreos sobre diferentes funciones celulares, el humo de cigarrillo tiene una composición compleja que permite postular que los efectos reales de este producto pueden ser aún más deletéreos a los ejercidos por un componente aislado como la nicotina. En efecto, el humo de cigarrillo contiene más de 4000 compuestos que pueden actuar individual o colectivamente como agentes patogénicos en un sinnúmero de enfermedades (Gao y cols., 2005). La fase particulada del humo de cigarrillo (condensado de humo de cigarrillo, CHC) está compuesta por diferentes elementos tóxicos tales como nicotina, fenol, hidrocarburos, nitrosaminas, metales pesados y agentes carcinógenos (Gao, Chen, Zhao, Rich, Chen, Li, Toselli, Stone y Li, 2005). Si bien numerosos trabajos han analizado los efectos de componentes aislados como la nicotina sobre la fisiología de fibroblastos gingivales o periodontales (Tipton y Dabbous, 1995; Giannopoulou, Geinoz y Cimasoni, 1999; Gamal y Bayomy, 2002), la contribución de estos compuestos en su conjunto al desarrollo de alteraciones patológicas del periodonto no ha sido estudiada con la profundidad necesaria.

### *1.3.1 Estudios celulares en el ámbito del efecto de CHC y nicotina sobre migración y diferenciación miobroblástica.*

El fenómeno de reparación tisular depende de una coordinada actividad de una variedad de procesos fisiológicos en una secuencia temporal específica. Luego de una

daño, distintas respuestas celulares tales como adhesión y migración celular, síntesis y remodelación de la matriz extracelular, proliferación y diferenciación celular, son observados en coordinación (Schaffer y Nanney, 1996). De consenso general es el hecho que distintos factores de crecimiento participan en este proceso de reparación (Werner y Grose, 2003). De hecho, prácticamente todas las etapas de la reparación tisular son controladas por una amplia gama de citoquinas y factores de crecimiento que actúan como reguladores locales de funciones celulares básicas (Schaffer y Nanney, 1996; Werner y Grose, 2003).

La migración celular es un evento particularmente relevante en la reparación de tejidos (Cáceres y cols., 2008), y esta respuesta se ve modulada de manera importante por diversos factores polipeptídicos que son liberados al tejido dañado luego de la injuria (Schaffer y Nanney, 1996; Werner y Grose, 2003). Un evento clave observado en este fenómeno es la diferenciación de células especializadas llamadas miofibroblastos (Powell, 2000). Se ha postulado recientemente que este fenotipo celular se deriva de fibroblastos residentes en el tejido, los que son activados por factores de crecimiento liberados por plaquetas y macrófagos activados en la herida (Werner y Grose, 2003). De estos factores, la mayor evidencia experimental muestra que TGF- $\beta$ 1 sería un factor clave en la inducción del fenotipo miofibroblástico (Desmoulière, 1995).

#### **1.4 Planteamiento del problema.**

En nuestra opinión, la evidencia científica muestra a la fecha datos inconsistentes en relación al papel ejercido por nicotina y por los componentes del humo de cigarrillo sobre células gingivales. Existe una gran variedad de estudios que han utilizado concentraciones no estandarizadas de nicotina como estímulo aislado sobre células gingivales en cultivo (Tipton y Dabbous, 1995; Lahmouzi y cols., 2000; Tanur, McQuade, McPherson, Al-Hashimi y Rivera-Hidalgo, 2000; Snyder y cols., 2002; Fang y Svoboda, 2005b; Zhou y cols., 2007) . La mayor parte de estos estudios ha utilizado concentraciones relativamente altas de nicotina considerando el siguiente análisis. Existen datos reportados en la literatura que indican que las concentraciones

de nicotina en sangre de fumadores crónicos alcanza valores de 0,025  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Russell y cols., 1975; Hill y Marquardt, 1980). En cigarrillos de investigación, como el 1R3F, con el cual se genera el CHC, la concentración de nicotina alcanza el 6,4% (College of Agriculture, 2009). Al tomar en cuenta estos datos, es posible considerar que los estudios que analicen los efectos de nicotina a concentraciones muy altas podrían estar subestimando los efectos de otros componentes presentes en el humo de cigarrillo que podrían afectar de manera importante funciones celulares críticas.

Considerando esta información, en el presente estudio hemos analizado la respuesta comparativa de cultivos primarios de fibroblastos gingivales de origen humano expuestos a condensado de humo de cigarrillo y las concentraciones equivalentes de nicotina presente en este compuesto. Se analizaron tres funciones celulares críticas en el proceso de respuesta a la injuria tisular tales como viabilidad, migración e invasión celular y diferenciación miofibroblástica.

## **2. HIPÓTESIS**

Por los antecedentes presentados se postula la siguiente hipótesis:

*“El condensado de humo de cigarrillo y la nicotina modulan diferencialmente la migración celular y diferenciación miofibroblástica en fibroblastos gingivales de origen humano.”*

## **3. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo es caracterizar el efecto del condensado de humo de cigarrillo y la nicotina sobre la migración y diferenciación miofibroblástica en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto del condensado de humo de cigarrillo y la nicotina sobre la viabilidad celular en fibroblastos gingivales humanos.
2. Evaluar el efecto del condensado de humo de cigarrillo y la nicotina sobre la migración celular en fibroblastos gingivales humanos.
3. Evaluar el efecto del condensado de humo de cigarrillo y la nicotina sobre la expresión del marcador de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA.

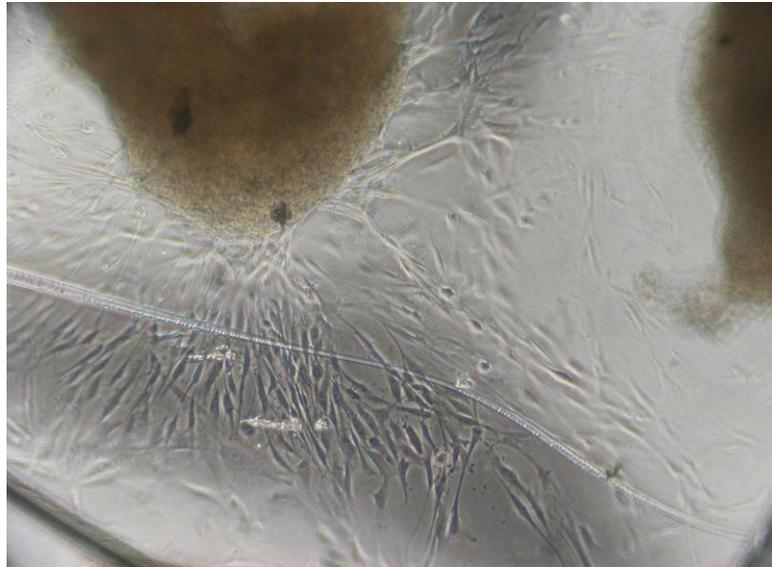
## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Instrumentos y equipos.**

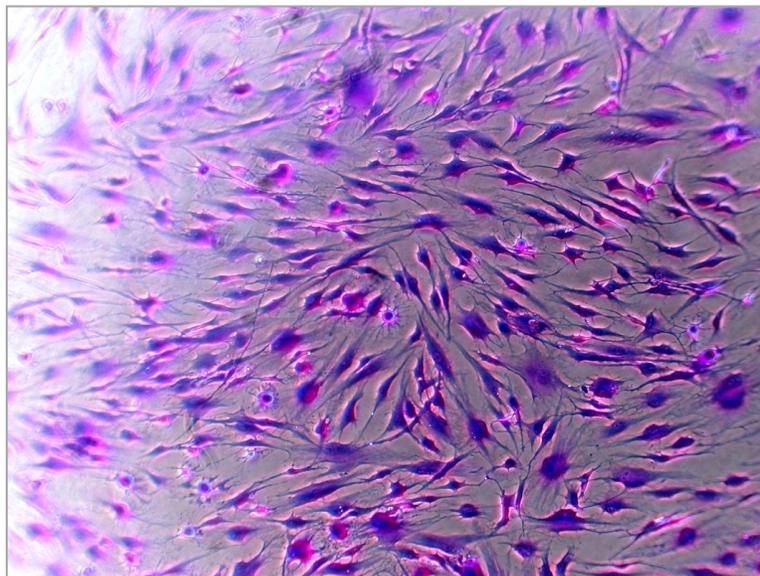
Los instrumentos y equipos utilizados son: Campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129; Incubador Lab-Line CO<sub>2</sub> automático; Cámaras de corrida y transferencia Bio-Rad Mini Protean III, Centrífuga Eppendorf 5415R; Baño seco Rocker Sahara 310 Heraeus; Fuente de poder Major Science mp 250V; Microscopio invertido de contraste de fase Nikon modelo TMS-F, Lector de placas Thermo Plate TP-Reader

### **5.2 Cultivo celular.**

Los protocolos de obtención de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos utilizados en este estudio fueron aprobados por los comités de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los cultivos primarios de FGH fueron obtenidos por el método del explante (Larjava y cols., 1989) (Figura 3), 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 no fumadores 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. La población de células resultantes fue cultivada en medio esencial mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM), el cual contenía suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100  $\mu$ g/mL de penicilina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU.), 100  $\mu$ g/mL de estreptomycin (Sigma) y 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (Sigma) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los experimentos fueron realizados entre el cuarto y décimo sub-cultivo (Figura 4).



***Figura 3. Explante de tejido gingival en cultivo.***



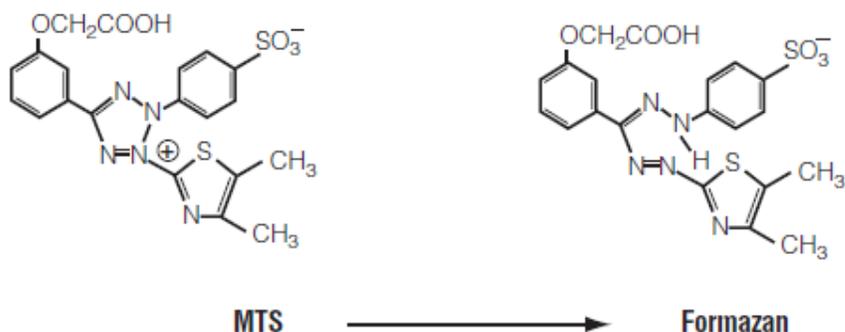
***Figura 4. Cultivo primario de FGH teñidos con cristal violeta. FGH fueron fijados en metanol frío por 10 minutos y luego teñidos con una solución de Cristal Violeta 0,5% en metanol al 20%. Posteriormente fueron lavadas con agua destilada y fotografiadas (Aumento 20X).***

### 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  $1 \times 10^6$  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 de la viabilidad celular de FGH mediante el ensayo de MTS.

Se sembraron FGH en placas de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^3$  por placa. Las células fueron privadas de SFB durante 24 horas, para luego ser expuestas a las condiciones determinadas de nicotina (Sigma), CHC (Murty Pharmaceuticals, Lexington, KY, USA) y ter-butil-peróxido. Al cabo del tratamiento, fueron expuestas a  $20 \mu\text{l}$  del reactivo colorimétrico de MTS (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Este compuesto tetrazolio (MTS o Reactivo de Owen) es bio-reducido por las células a un producto formazan coloreado, que es soluble en medio de cultivo (Figura 5). Esta conversión es llevada a cabo por NADPH o NADH producido por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. Luego de 1-4 horas de incubación a  $37$  °C, se leyó la absorbancia a  $492$  nm en un lector de microplacas.



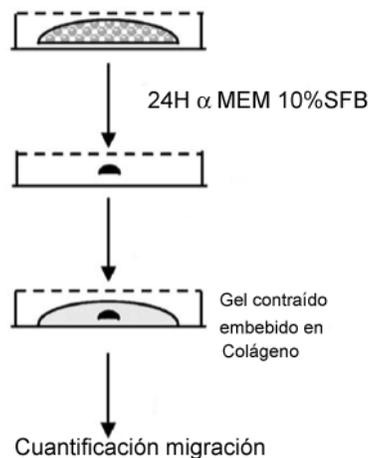
*Figura 5. Reducción del compuesto tetrazolio MTS a su producto formazan.*

### 5.5 Migración en cierre de heridas.

Se sembraron FGH en placas de 24 pozos a densidad 80% y fueron llevados a confluencia en SFB 10%. Las células fueron entonces privadas de SFB durante 24 horas, y una vez concluido este lapso de tiempo, se realizaron heridas en la monocapa celular con una punta de pipeta estéril, y lavadas suavemente con PBS 1X. Durante el proceso de cierre de herida, los FGH fueron expuestos a concentraciones determinadas de nicotina y CHC, en SFB 1%, durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron teñidas con cristal violeta para la visualización y cuantificación de la migración celular hacia la zona de la herida inicial. Esta cuantificación fue representada como número promedio de células por campo fotográfico.

### 5.6 Migración celular en nidos de colágeno.

Se sumergieron  $1 \times 10^5$  células en un gel 3D de colágeno (1,5 mg/mL) con un volumen final de 150  $\mu$ L en placa de 96 pozos. Después de ser incubados durante 24 horas en  $\alpha$ -MEM suplementado con SFB al 10%, los geles contraídos se traspasaron a una placa de 24 pozos sobre 50  $\mu$ L de colágeno y encima los 150  $\mu$ l restantes de colágeno previamente neutralizado (Grinnell y cols., 2006). Después de 48 horas en presencia de Nicotina y CHC en SFB 1%, se cuantificó la migración, expresada como número promedio de células por campo fotográfico. (Figura 6).



**Figura 6. Modelo de migración tridimensional de nidos de colágeno.**

### **5.7 Migración celular en sistema bicameral (Transwell).**

Para evaluar la capacidad de invasión de FGH expuestos a nicotina y CHC, se utilizó un sistema bicameral transwell. El compartimento superior del transwell fue incubado con 100  $\mu$ l de Matrigel diluido (1  $\mu$ g/mL) (BD Biosciences) a 4 °C durante 24 horas. Paralelamente, FGH sembrados en placas de 24 pozos fueron pre-estimulados con nicotina o CHC durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los FGH fueron liberados de la placa con tripsina-EDTA (Gibco, BRL, Grand Island, NY, EEUU), para luego ser sembrados en el compartimento superior del transwell, en las mismas condiciones iniciales de nicotina o CHC, durante 24 horas más. En cada caso, el compartimento inferior del transwell contenía SFB al 1% o SFB al 10% como control positivo de invasión celular. Concluidas las 48 horas totales de exposición, los transwell fueron removidos y teñidos con cristal violeta, para la visualización y cuantificación de FGH.

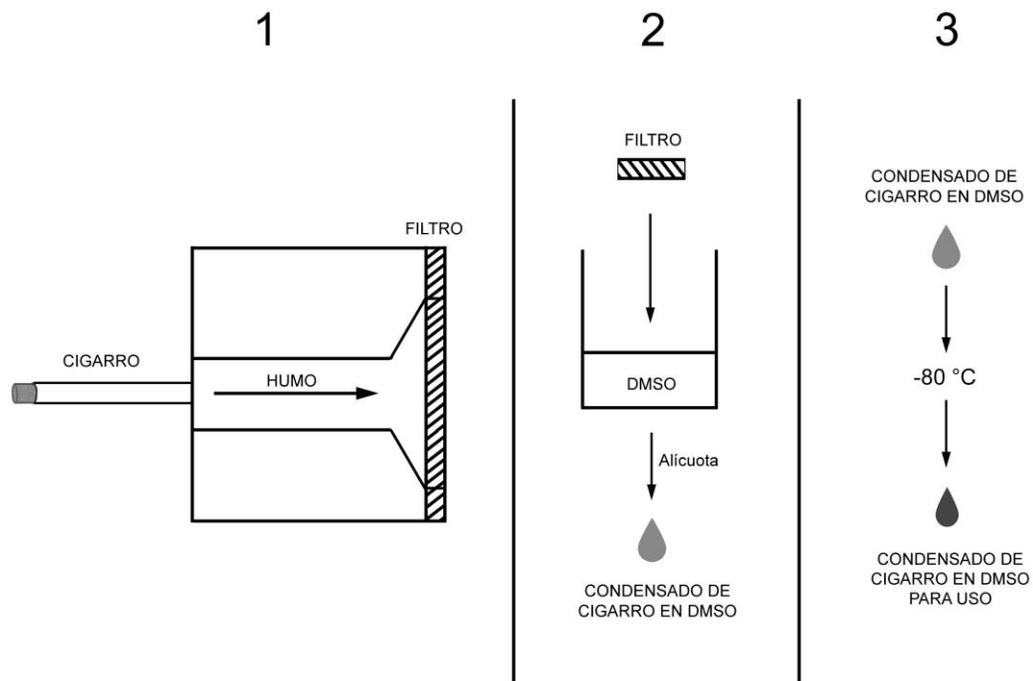
### **5.8 Inmunoblot.**

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  $\mu$ g/mL, NaF 5 mM, ortovanadato de sodio (Sigma) 1 mM y NEM 1 mM a 4°C. Los lisados fueron incubados durante 10 minutos 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  $\beta$ -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)(80-100 V) y transferidas a membranas de difluoro-polivinilideno (PVDF, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, EEUU) activada en metanol durante 1 minuto, 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%). Después de esto, se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -SMA (Sigma, clon 1A4), diluido 1:1000 en TBS-Tween-20 al 0,1% y leche descremada al 3% durante 12h a 4°C con agitación. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga (1:5.000; Sigma, clon AC-15). 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 (Western Lightning ECL, Perkin Elmer) y la detección se realizó con películas fotográficas (Kodak). Luego, las películas fueron digitalizadas y cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, NIH)

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  $\beta$ -actina, utilizándolos como control de carga de proteínas en el gel.



**Figura 7. Obtención del condensado de humo de cigarrillo.** (1) Cigarrillos de investigación 13RF son encendidos en una máquina de fumar automática Phipps & Bird de 20 canales. (2) La fase particulada del humo es retenida en un filtro de 44mm, y luego recuperada en un solvente (DMSO). La masa total de particulado se determina por el diferencial de masa del filtro antes y después del proceso. (3) El condensado de humo de cigarrillo es alicuotado y congelado a -80 °C para su uso posterior.

## **6. RESULTADOS**

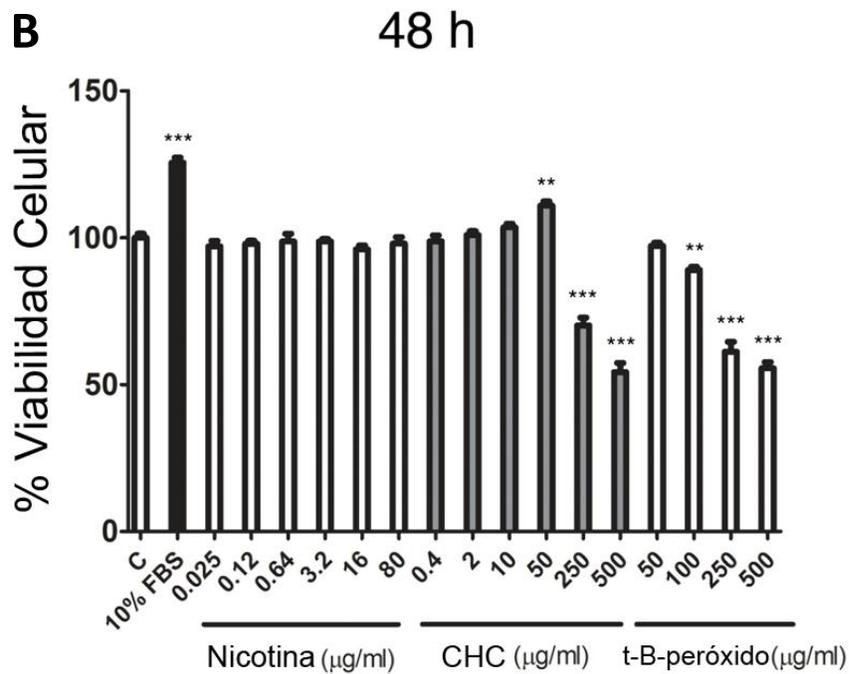
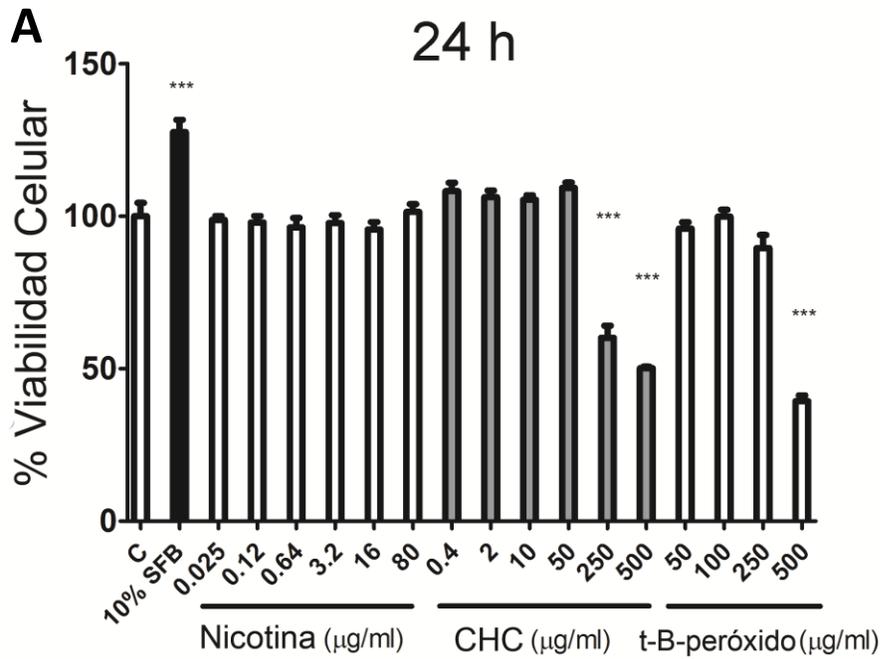
### **6.1 Definición de las concentraciones de uso de CHC y nicotina.**

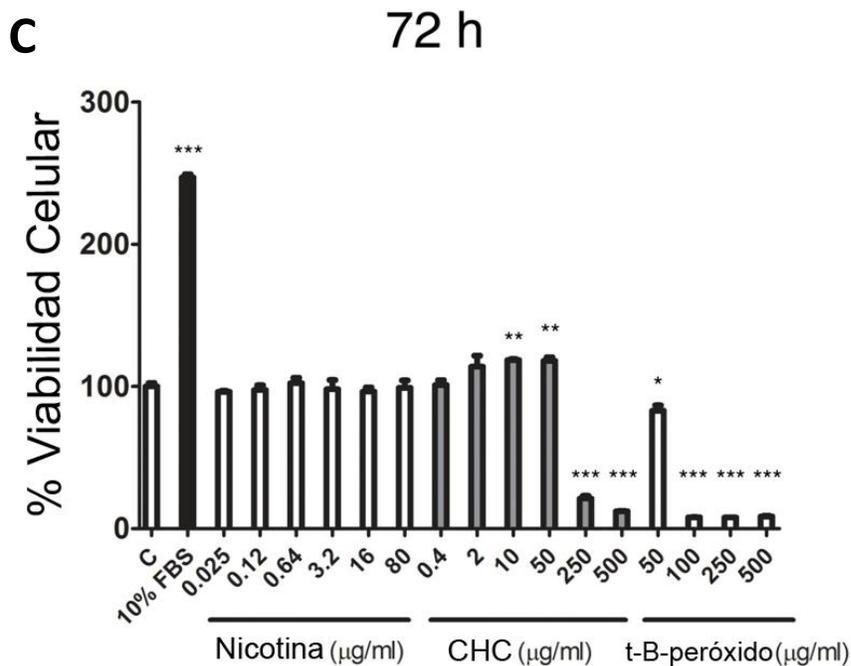
Con el propósito de analizar el efecto de CHC y nicotina sobre la capacidad de migración y diferenciación miofibroblástica se definió las concentraciones que tuvieran relevancia fisiológica. En fumadores crónicas de 10 a 20 cigarrillos al día, las concentraciones de nicotina en plasma alcanzan valores entre 0,025  $\mu\text{g/mL}$  (Hill y Marquardt, 1980; Russell, Wilson, Patel, Feyerabend y Cole, 1975). La proporción de nicotina en el cigarrillo de investigación 1R3F, con el cual se generó el CHC utilizado en este estudio, es de 6,4% (College of Agriculture, 2009). Considerando entonces estos valores, se definió una concentración mínima de nicotina para el estímulo de las células que fuera equivalente a la concentración observada en el plasma de fumadores crónicos (0,025  $\mu\text{g/mL}$ ) y su equivalente en CHC que correspondió a 0,2  $\mu\text{g/mL}$ . Este permitió generar las condiciones en las cuales se desarrollaron los experimentos aquí descritos.

### **6.2 Efectos del CHC y nicotina sobre la viabilidad celular en FGH.**

El objetivo principal del estudio se enfocó en caracterizar los efectos de CHC y nicotina sobre la migración y diferenciación de miofibroblastos. Estos corresponden a efectos subletales de los agentes en estudio. Bajo esta premisa se identificó inicialmente las concentraciones subletales y letales para nicotina y CHC en FGH. FGH, privados de SFB durante 24 horas, fueron estimulados con concentraciones crecientes de CHC, y sus equivalentes de nicotina durante 24, 48 y 72 horas en ausencia de SFB. Se utilizó ter-butíil-peróxido como control del daño celular inducido por stress oxidativo. La viabilidad celular fue determinada por ensayos de MTS. La Figura 8 muestra el efecto de esta exposición, donde la nicotina, en su rango completo, no ejerció ningún efecto sobre la viabilidad celular en comparación a su control (DMSO). En el caso del CHC, concentraciones iguales o superiores a 250  $\mu\text{g/mL}$  mostraron un efecto citotóxico a las 24, 48 y 72 horas. A concentraciones intermedias (10 – 50  $\mu\text{g/mL}$ ), CHC ejerció un incremento moderado de la viabilidad celular. El análisis estadístico de estos resultados, demostró que CHC indujo un aumento significativo en la viabilidad celular a 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ), y una reducción de ésta a 250

y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,01$ ) a las 48 horas (Figura 8). Después de 72 horas, el efecto de inducción en la viabilidad celular pudo observarse, además, a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CHC (Figura 8). El estímulo de las células con ter-butil-peróxido indujo una respuesta citotóxica a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .





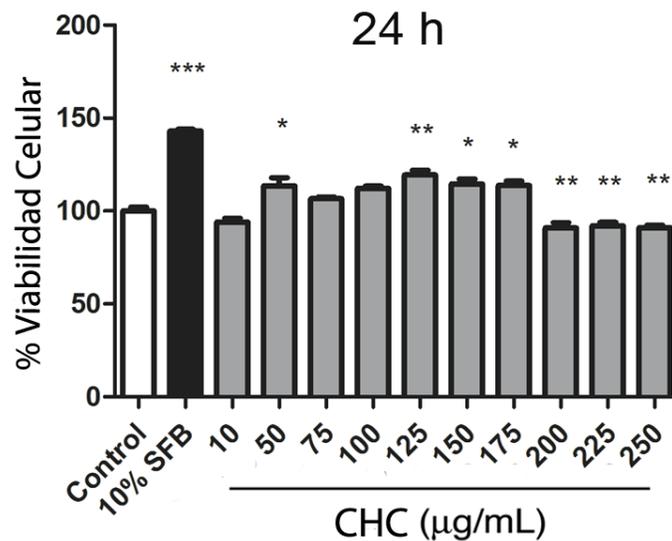
**Figura 8. Modulación de la viabilidad celular por CHC y nicotina.** FGH privados de SFB durante 24 horas fueron estimulados con concentraciones crecientes de CHC, nicotina y ter-butil-peróxido durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C). Los gráficos muestran el promedio y error estándar de la cuantificación de los compuestos de formazán medidos a 490 nm (MTS) normalizado con respecto al control. Como control positivo de viabilidad se utilizó SFB al 10%. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas al comparar la situación experimental con el control sin estímulo (vehículo) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) (Test de Dunnett).

### 6.3 Efectos del CHC y nicotina sobre la migración celular.

Con el objetivo de analizar la viabilidad celular en condiciones de un rango más estrecho de concentraciones y considerando que CHC fue el único agente que indujo una respuesta citotóxica, se procedió a evaluar las respuestas de FGH estimulados a valores de CHC entre 50 y 250 µg/mL.

La Figura 9 muestra el efecto del tratamiento de FGH con concentraciones crecientes de CHC a 24 h en el rango mencionado. Se observó que a concentraciones intermedias (50 – 175 µg/mL) el CHC estimuló significativamente ( $p < 0,05$ ) la viabilidad

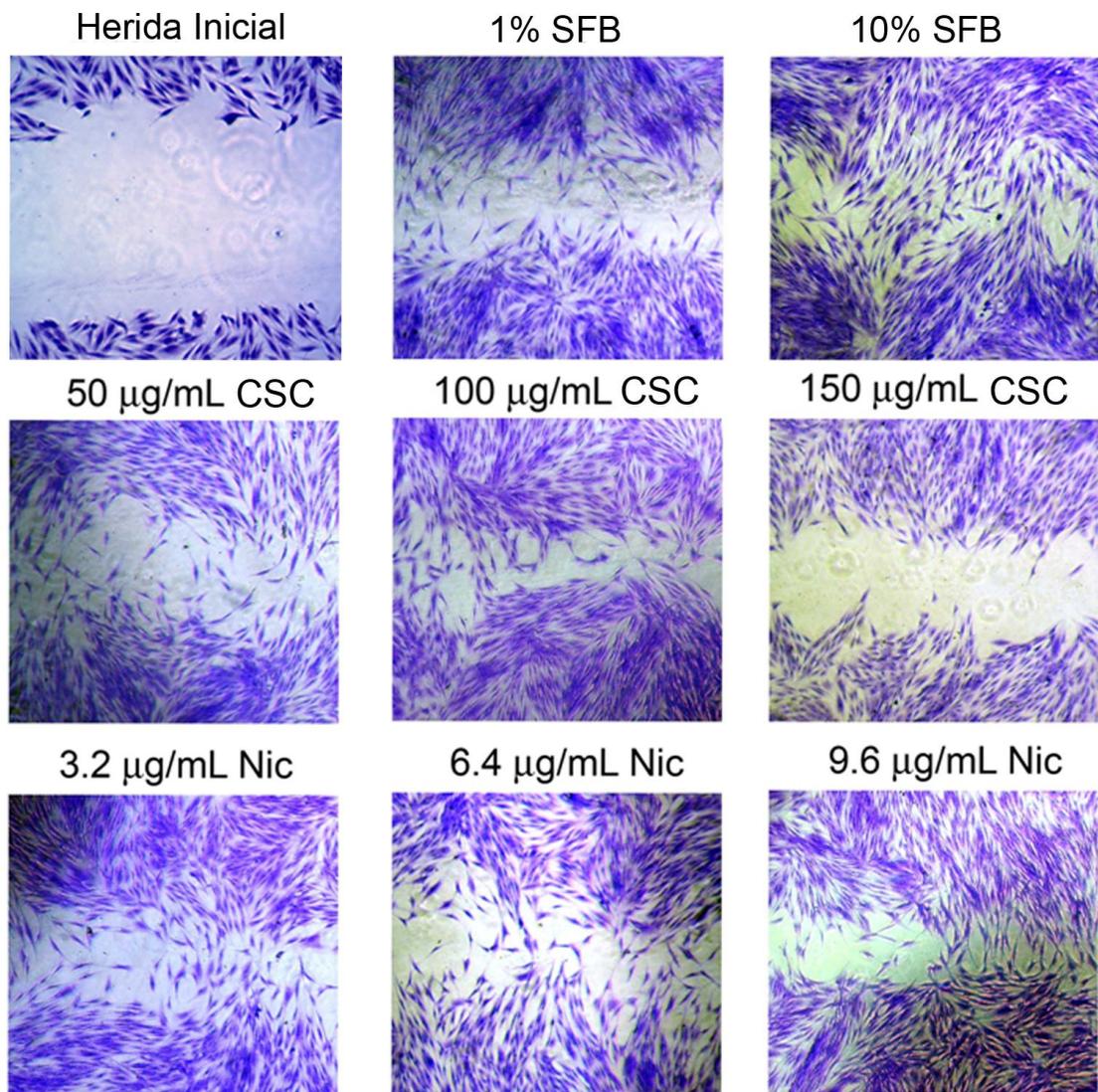
celular. Por otro lado, a partir de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observó una reducción de esta respuesta. A partir de estos resultados pudimos seleccionar concentraciones subletales de CHC (50, 100 y 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con el fin de evaluar el efecto de este agente sobre la migración celular en ensayos de cierre de heridas.



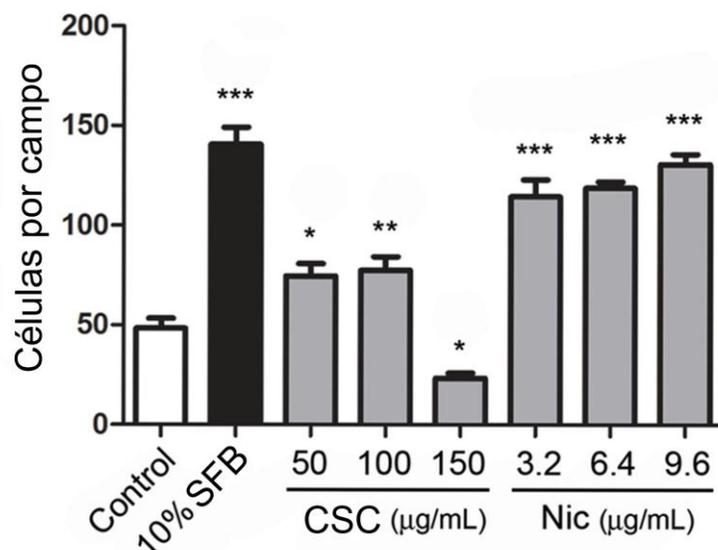
**Figura 9. Viabilidad celular a 48 horas en presencia de SFB al 1%. FGH privados de SFB durante 24 horas fueron estimulados con concentraciones crecientes de CHC durante 24 horas en ausencia de SFB. El gráfico muestran el promedio y error estándar de la cuantificación de los compuestos de formazán medidos a 490 nm (MTS) normalizado con respecto al control. Como control positivo de viabilidad se utilizó SFB al 10%. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas al comparar la situación experimental con el control sin estímulo (vehículo) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). (Test de Dunnett).**

#### **6.4 Migración en cierre de heridas en monocapa.**

Para evaluar el efecto de nicotina y CHC sobre la migración de FGH, se utilizó en primera instancia el modelo (bidimensional-2D) de migración sobre heridas en una monocapa. Las heridas fueron realizadas sobre una monocapa semiconfluyente de FGH privadas de SFB durante 24 horas. Luego de realizadas las heridas, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de CHC (50, 100, 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y sus equivalentes respectivos de nicotina (3,2; 6,4; 9,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en medio con SFB al 1% (16 horas). Los resultados ilustrados en la Figura 10 muestran que, a concentraciones bajas de CHC (50-150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), los FGH demostraron una mayor capacidad migratoria en comparación con la condición control (SFB al 1%), mientras que a la mayor concentración utilizada (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), éstos exhibieron una marcada disminución en la migración en relación al control. En el caso de nicotina, las tres concentraciones utilizadas estimularon la migración con respecto al control (SFB al 1%). Los datos de migración fueron cuantificados y expresados en el gráfico de la Figura 11. En este se puede observar que el estímulo de las células con CHC (50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y nicotina (3,2; 6,4 y 9,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), resultó en un incremento estadísticamente significativo en la migración celular. Por el contrario, el estímulo con CHC (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) resultó en una inhibición de esta respuesta.



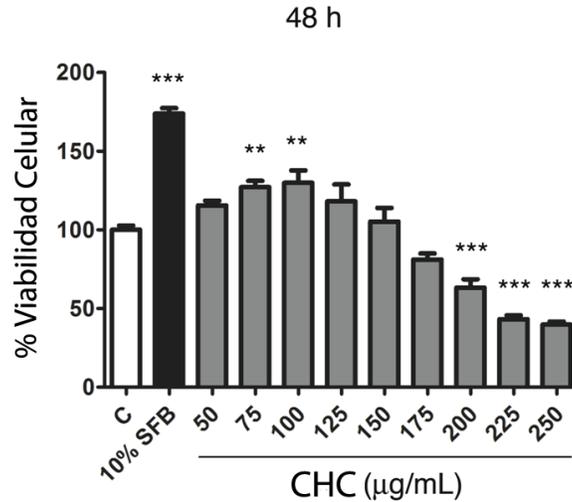
**Figura 10. Efectos del CHC y nicotina sobre la migración celular en monocapa.** Se realizaron heridas en una monocapa semiconfluyente de fibroblastos gingivales humanos privados de SFB durante 24 horas. Durante el cierre de heridas, las células fueron expuestas a distintas concentraciones de CHC, y sus equivalentes de nicotina, durante 16 horas, en presencia de 1% SFB. FGH fueron teñidos con cristal violeta para su visualización.



**Figura 11. Cuantificación de células en migración en monocapa.** Se representa el promedio de células migrantes más error estándar (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) (Test de Dunnett).

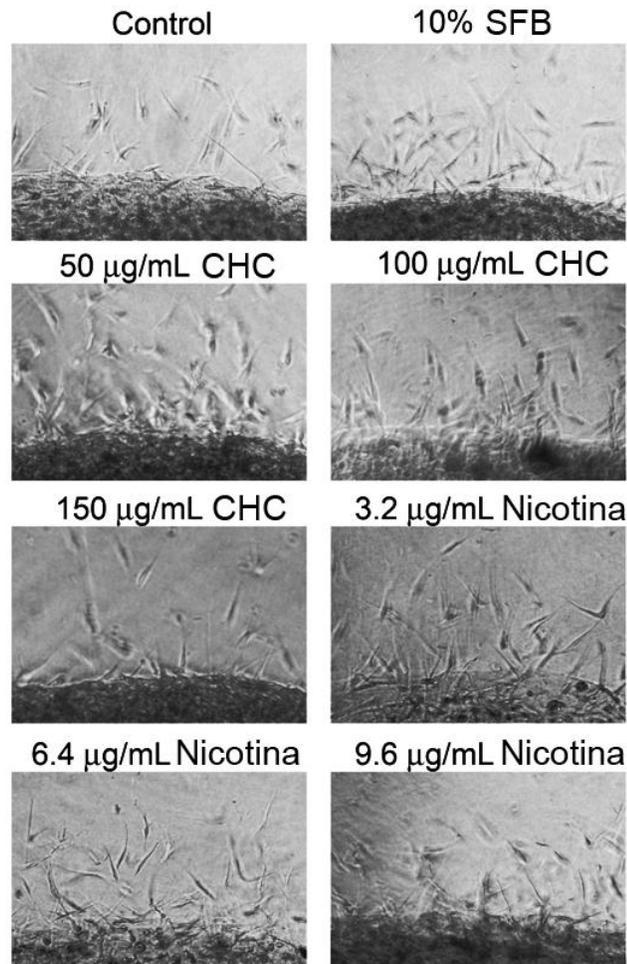
### 6.5 Migración en nidos.

Se decidió evaluar la capacidad de migración celular utilizando un modelo de migración en nido en el cual las células se cultivan inmersas en un gel de colágeno y se analiza la salida de células desde este primer gel a un segundo gel de colágeno que rodea al primero. Considerando que este ensayo demora 48 horas y que se realiza en presencia de SFB al 1%, se evaluó la viabilidad celular durante este tiempo en presencia de CHC y nicotina. Se observó un incremento en la viabilidad celular a 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  (CHC) que resultó ser estadísticamente significativo. Por otro lado, concentraciones de CHC iguales o superiores a 200  $\mu\text{g/mL}$  indujeron una disminución significativa en la viabilidad celular compatible con una respuesta citotóxica (Figura 12). A partir de este resultado se determinó utilizar dosis de 50, 100 y 150  $\mu\text{g/mL}$  de CHC para evaluar la respuesta de FGH.



**Figura 12. Viabilidad celular a 48 horas en presencia de SFB al 1%. FGH privados de SFB durante 24 horas fueron estimulados con concentraciones crecientes de CHC durante 48 horas. Los gráficos muestran el promedio y error estándar de la cuantificación de compuestos de formazán medido a 490 nm (MTS) normalizado con respecto al control. Como control positivo de viabilidad se utilizó SFB al 10% (n=8). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas al comparar la situación experimental con el control sin estímulo (vehículo) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). (Test de Dunnett).**

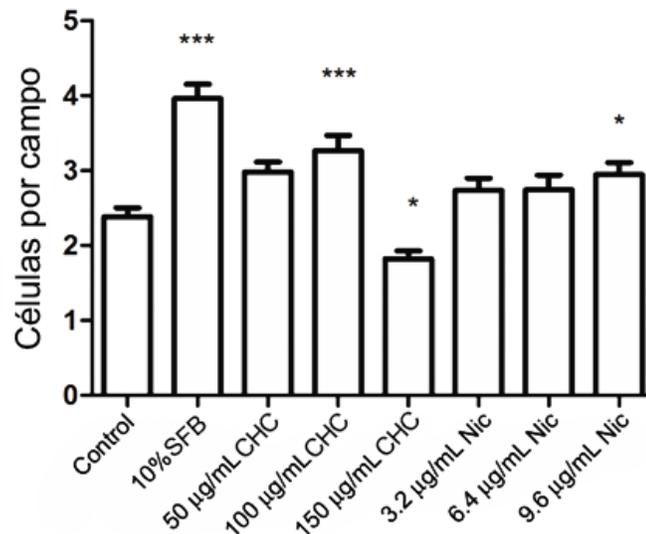
El modelo de migración tridimensional desde nidos de colágeno representa un acercamiento particularmente próximo a las condiciones fisiológicas. Para realizar este ensayo, FGH fueron polimerizados durante 24 horas al interior de una matriz de colágeno hasta su máxima contracción. Luego este gel fue incorporado al interior de un segundo gel libre de células hacia el cual las células migraron. La Figura 13 muestra el efecto de las concentraciones seleccionadas de CHC, y sus equivalentes de nicotina, sobre esta matriz de colágeno. En esta se puede observar que, de manera similar al resultado de migración en monocapa, las concentraciones de CHC 50 y 100 µg/mL estimularon la migración celular mientras que 150 µg/mL inhibió esta respuesta. Por otro lado, nicotina no afectó mayormente la capacidad migratoria exceptuando la mayor concentración utilizada (9,6 µg/mL) que la estimuló en forma significativa.



**Figura 13. Efecto de CHC y nicotina sobre la migración celular en modelo tipo nido.** Fibroblastos gingivales humanos fueron polimerizados durante 24 horas dentro de una matriz de colágeno hasta su máxima contracción, y posteriormente incorporados al interior de una segunda matriz de colágeno libre de células. Se muestra el efecto de concentraciones crecientes de CHC, y sus equivalentes de nicotina, sobre la migración celular hacia la matriz externa de colágeno.

La cuantificación de los resultados de migración en nido demostró que 100  $\mu\text{g/mL}$  de CHC estimuló significativamente esta respuesta. Por otro lado, 150  $\mu\text{g/mL}$  de CHC indujo una inhibición significativa. En el caso de nicotina, la migración celular no se vio alterada, salvo en el caso del estímulo con 9,6  $\mu\text{g/mL}$  que indujo un leve

incremento en la capacidad de migración. Todas estas comparaciones fueron hechas con respecto al control con SFB 1% (vehículo) (Figura 14).

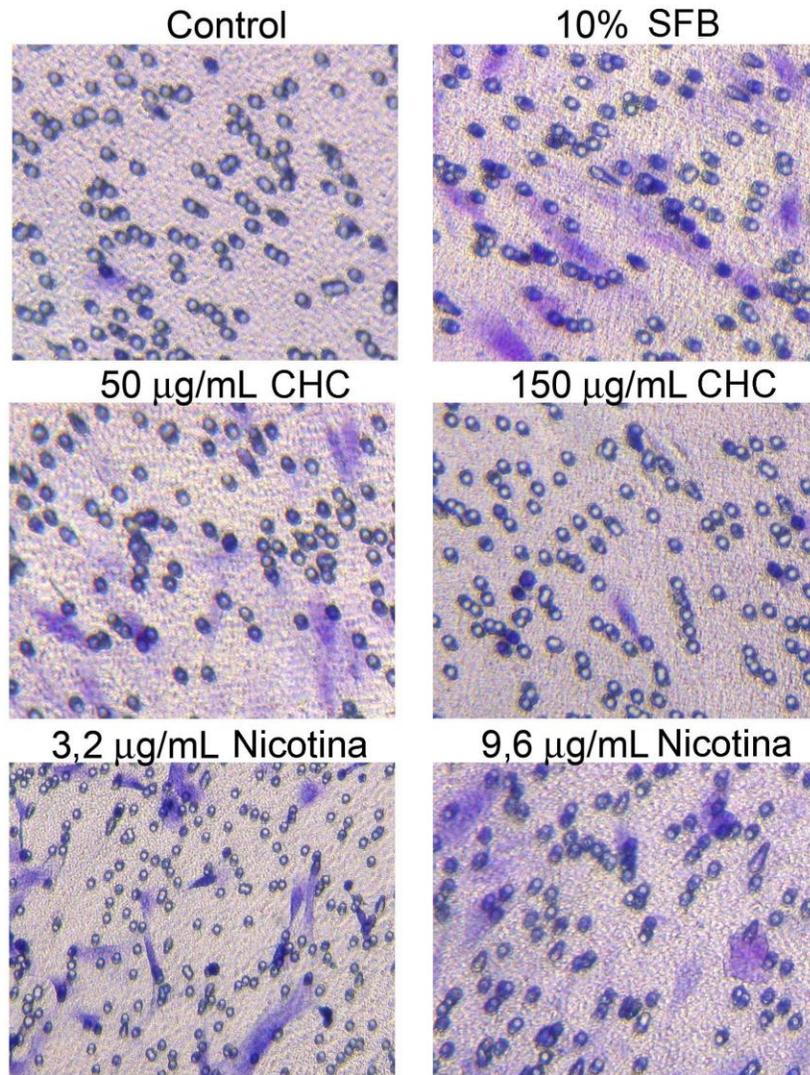


**Figura 14. Cuantificación de células en migración en nido.** Se representa el promedio de células migrantes más error estándar ( $n=3$ ) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) (Test de Dunnett).

### 6.6 Migración en sistema bicameral (invasión).

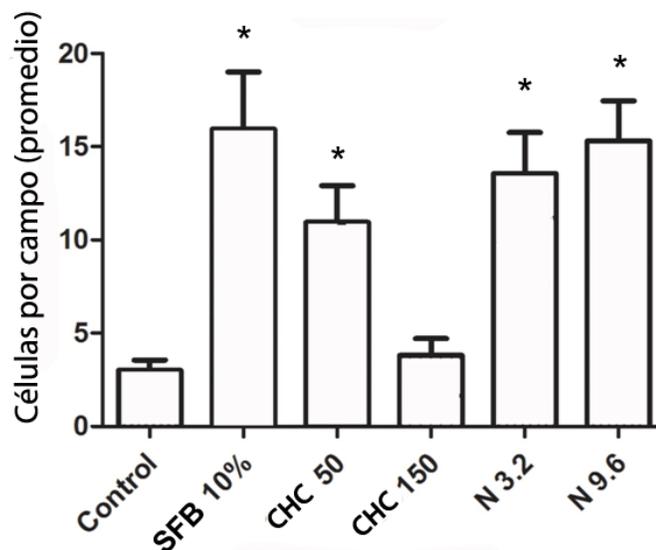
Un tercer modelo de aplicación para evaluar el fenómeno migratorio es el sistema bicameral de migración/invasión celular. En este caso, además de evaluar la capacidad migratoria, el ensayo permite analizar la invasión de la matriz extracelular (Matrigel) ubicada sobre el filtro del sistema bicameral. Para realizar este experimento, FGH pre-estimulados durante 24 horas con CHC o nicotina fueron sembrados en el compartimento superior del sistema, sobre la película de Matrigel. Al compartimento inferior del sistema se le adicionó SFB como efector quimiotáctico (1%), y los FGH fueron tratados nuevamente con las dosis correspondientes de nicotina y CHC durante 24 horas, para completar 48 horas de tratamiento. Como control positivo de migración celular se utilizó SFB al 10% (en el compartimento inferior del sistema bicameral). En la Figura 15 se muestran imágenes representativas de los filtros observándose las

células que se encuentran en activa migración. Se pudo observar que el CHC a 50  $\mu\text{g/mL}$ , y en menor medida nicotina a las dos concentraciones evaluadas, estimuló la capacidad de migración celular en comparación con las células control. El CHC a 150  $\mu\text{g/mL}$  no afectó la capacidad de migración celular.



**Figura 15. Efecto de CHC y nicotina sobre la migración e invasión en modelo bicameral.** Fibroblastos gingivales humanos, privados de SFB durante 24 horas fueron pretratados durante 24 horas con distintas concentraciones de CHC y sus equivalentes de nicotina. Posteriormente las células fueron sembradas en el compartimento superior del transwell. 24 horas después los fibroblastos fueron teñidos con cristal violeta para su visualización.

La Figura 16 muestra la representación gráfica de la migración en sistema bicameral. Se puede observar que el estímulo de CHC (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y nicotina (3,2 y 9,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) resultaron ser estadísticamente significativos con respecto al control. El estímulo con CHC 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no indujo un cambio significativo en la respuesta migratoria respecto del control.

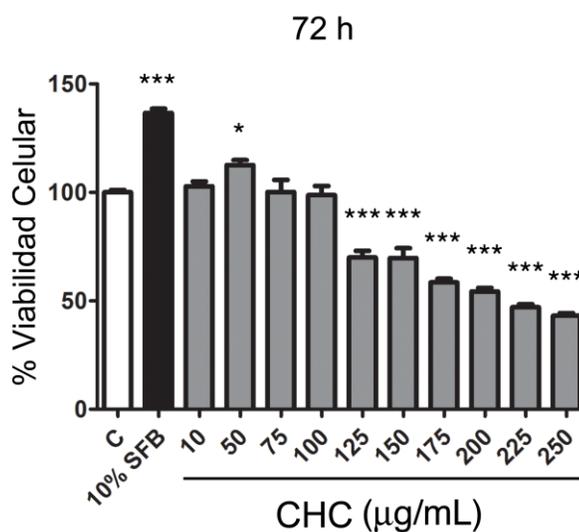


**Figura 16. Cuantificación de células en migración e invasión en sistema bicameral.** Se representa el promedio de células migrantes más error estándar ( $n=3$ ) (\*  $p < 0,05$ ) (Test de Dunnett). CHC=condensado de humo de cigarrillo; N= nicotina; SFB= suero fetal bovino.

### 6.7 Efectos del CHC sobre la diferenciación miofibroblástica.

Para evaluar los efectos de nicotina y CHC sobre el fenómeno de diferenciación miofibroblástica, se analizó la capacidad de estos agentes para modular la expresión del marcador de miofibroblastos actina de músculo liso tipo alfa ( $\alpha$ -SMA). La expresión de  $\alpha$ -SMA se encuentra fuertemente regulada por el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1). Es por esto que al estímulo de este factor de crecimiento se adicionó la presencia de nicotina o CHC en diferentes concentraciones.

Teniendo en consideración que la expresión de  $\alpha$ -SMA se produce a niveles máximos a las 72 horas, se realizó una nueva prueba de viabilidad celular a este tiempo de exposición a CHC. El resultado de esta evaluación se muestra en la Figura 17, en donde el estímulo con concentraciones iguales o superiores a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CHC indujeron una inhibición en la viabilidad celular. Por otro lado, el estímulo con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CHC indujo un leve pero significativo incremento en la viabilidad celular.

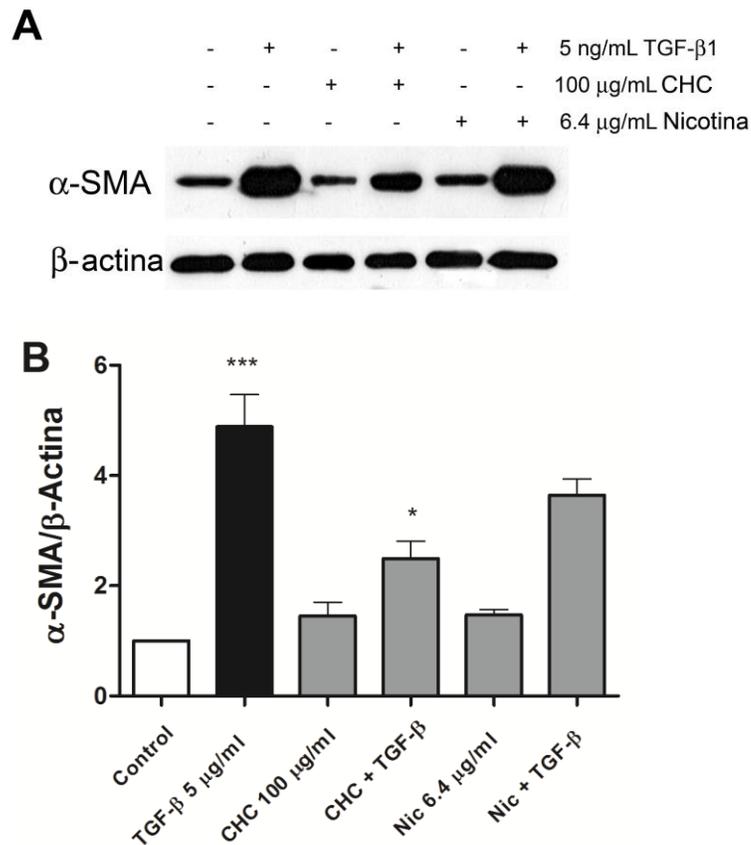


**Figura 17. Viabilidad Celular a 72 horas de exposición a CHC.** FGH privados de SFB durante 24 horas fueron estimulados con concentraciones crecientes de CHC durante 72 horas. Los gráficos muestran el promedio y error estándar de la cuantificación de compuestos de formazán medido a 490 nm (MTS) normalizado con respecto al control. Como control positivo de viabilidad se utilizó SFB al 10% ( $n=8$ ). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas al comparar la situación experimental con el control sin estímulo (vehículo) (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$ ). (Test de Dunnett).

### 6.8 Efectos del CHC y nicotina sobre producción de $\alpha$ -SMA.

FGH sembrados a confluencia fueron expuestos a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHC, y su concentración equivalente de nicotina (6,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se escogió esta concentración de CHC y nicotina considerando que este nivel de exposición a los agentes en estudio representó la máxima dosis que no afectó la viabilidad celular. Luego de 72 horas los cultivos fueron lisados para analizar por Western-blot los niveles relativos de  $\alpha$ -SMA.

La Figura 18A muestra que el estímulo con TGF- $\beta$ 1 indujo fuertemente la diferenciación miofibroblástica (evaluada por los niveles del marcador  $\alpha$ -SMA). Por otro lado, los estímulos con CHC y nicotina redujeron los niveles del marcador al compararlo con el nivel estimulado con TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, el análisis estadístico de estos datos demostró que sólo el CHC redujo significativamente los niveles de  $\alpha$ -SMA (Figura 18B).



**Figura 18. Efecto de CHC y nicotina sobre los niveles relativos de  $\alpha$ -SMA (A)** FGH fueron expuestos a 100  $\mu$ g/mL de CHC y 6,4  $\mu$ g/mL de nicotina, por 1 hora, y luego expuestos a 5 ng/mL de TGF- $\beta$ . Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. **(B)** El gráfico muestra el análisis cuantitativo de los Western-blot. Estos datos, obtenidos de tres experimentos independientes fueron expresados como promedio y error estándar ( $n=3$ ). El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición estimulada con TGF- $\beta$ . El triple asterisco (\*\*\*) indica diferencias entre el estímulo con TGF- $\beta$ 1 y la situación control (vehículo).

## **7. Discusión.**

El presente estudio muestra que el CHC, fracción particulada del humo de cigarrillo, puede tener un efecto no descrito previamente sobre los fenómenos de migración celular y diferenciación miofibroblástica. Históricamente se ha asociado a la nicotina como el principal efector de las alteraciones celulares causadas por el tabaquismo (Koide y cols., 2005; Liu y cols., 2010). Sin embargo, el humo de cigarrillo posee una serie de componentes que pueden actuar sobre células y tejidos causando trastornos en su estructura y fisiología (Wong y Martins-Green, 2004). Nuestros resultados obtenidos en cultivos primarios de fibroblastos gingivales demuestran que CHC, y no nicotina, ejerce efectos diferenciales en los fenómenos descritos, estimulando la migración celular a bajas concentraciones, e inhibiéndola notablemente a concentraciones superiores. Por otro lado, los resultados muestran que el CHC, y no nicotina, es capaz de inhibir significativamente el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles de  $\alpha$ -SMA, proteína marcadora de la diferenciación miofibroblástica. A nuestro juicio, estos resultados representan información novedosa que aporta a definir el papel de nicotina y de la fase particulada del humo de cigarrillo sobre la respuesta reparativa de células mesenquimales del tejido gingival.

Un gran número de estudios ha analizado los efectos de nicotina, como estímulo único, sobre variadas respuesta celulares relacionadas con la reparación tisular tales como migración (Tanur, McQuade, McPherson, Al-Hashimi and Rivera-Hidalgo, 2000; Fang y Svoboda, 2005a; San Miguel y cols., 2010a), proliferación (Tipton y Dabbous, 1995; Gullihorn y cols., 2005) viabilidad - muerte celular (Luppi y cols., 2005; San Miguel y cols., 2010b), producción y degradación de MEC (Giannopoulou, Geinoz y Cimasoni, 1999; Katono y cols., 2009; Takeuchi y cols., 2010). Si bien nicotina, puede tener efectos celulares deletéreos sobre este tipo de respuestas, su efecto principal tiene que ver con los fenómenos de adicción y dependencia al hábito de fumar (Gamberino y Gold, 1999; Laviolette y van der Kooy, 2004). En contraste con este hecho, el humo de cigarrillo contiene una gran variedad de compuestos que podrían afectar la función celular de diversas maneras (Gao, Chen, Zhao, Rich, Chen, Li, Toselli, Stone y Li, 2005) . Sin embargo, son pocos los estudios

que han abordado los efectos del humo de cigarrillo, representado experimentalmente como el CHC (Gonzalez y cols., 2009) o como extracto de humo de cigarrillo (Chen y cols., 2009). En el caso de células del tejido gingival, este tipo de análisis se han restringido al estudio de CHC sobre la producción de uPA (Gonzalez, Arancibia, Cáceres, Martínez y Smith, 2009) y de MMPs (Zhou, Olson y Windsor, 2007; Zhang y cols., 2009). En este contexto, esta tesis cobra especial validez considerando la falta de información disponible en la literatura.

### **7.1 Definición de concentraciones de nicotina y CHC.**

Un elemento importante de este estudio fue la determinación de la concentración de nicotina y CHC a la cual se expondrían los cultivos celulares. Algunos estudios han estimado la disponibilidad de nicotina en la cavidad bucal al momento de fumar un cigarrillo (Fang y Svoboda, 2005a). Sin embargo, la nicotina se encuentra frecuentemente deprotonada y en este estado su identificación en boca es técnicamente muy compleja (Kyerematen y cols., 1982; Tundulawessa y cols., 2010). Dentro de estas mismas consideraciones, se destaca también el hecho que algunos estudios no se rigen por la factibilidad de encontrar las concentraciones en uso en un fumador crónico. Buscando un acercamiento reproducible referente a las concentraciones de nicotina que podría presentar un paciente, se encontró que la concentración plasmática de un metabolito de la nicotina, cotinina, es un parámetro bien utilizado para identificar la exposición al humo de tabaco (Hill y Marquardt, 1980; Kyerematen, Damiano, Dvorchik y Vesell, 1982). Específicamente, se ha descrito que un fumador crónico presenta alrededor de 0,025  $\mu\text{g/mL}$  de nicotina en el plasma (Russell, Wilson, Patel, Feyerabend y Cole, 1975; Hill y Marquardt, 1980). Considerando que la nicotina representa el 6,4% del material particulado total del cigarrillo de investigación 1R3F (College of Agriculture, 2009), se decidió utilizar una concentración proporcional de nicotina partiendo por 3,2  $\mu\text{g/mL}$  y el valor correspondiente de CHC (50  $\mu\text{g/mL}$ ).

## **7.2 Efectos de nicotina y CHC sobre viabilidad celular.**

Uno de nuestros resultados deriva de la comparación en la viabilidad celular modulada por CHC y nicotina. Nuestros datos mostraron que a concentraciones correspondientes de nicotina y de CHC, sólo CHC fue capaz de modificar la viabilidad celular. A concentraciones subletales de CHC, este agente demostró ser capaz de inducir un leve aumento en la viabilidad celular. En concordancia con este resultado, estudios previos han mostrado que fibroblastos fetales de pulmón expuestos a extracto de humo de cigarrillo (EHC) manifiestan una respuesta caracterizada por un incremento en la formación de contactos de adhesión celular y activación de las vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular tales como la vía MAPK/ERK. (Carnevali y cols., 1998; Chen, Lii, Ku y Wang, 2009)

Nuestros resultados mostraron un efecto citotóxico inducido por CHC. Sin embargo, el estímulo de las células con concentraciones equivalentes de nicotina no indujo alteraciones en la viabilidad de los cultivos. Es interesante destacar que en diversos estudios se ha caracterizado la muerte celular inducida por nicotina (Zhou, Olson y Windsor, 2007; Zhang, Song y Windsor, 2009). Un análisis de las concentraciones que han utilizado estos estudios ha mostrado que estas corresponderían a valores excesivamente altos para CHC (3,9 mg/mL). Claramente pensamos que en estas condiciones la nicotina no tendría un efecto específico ya que las células, probablemente, ya habrían sido dañadas previamente por los componentes del CHC.

Considerando que el humo de cigarrillo presenta más de 4000 compuestos (Gao, Chen, Zhao, Rich, Chen, Li, Toselli, Stone y Li, 2005), es muy difícil atribuir el efecto citotóxico a algún componente específico, toda vez que existe una gran proporción que aun no ha sido catalogada (Gao, Chen, Zhao, Rich, Chen, Li, Toselli, Stone y Li, 2005). Sin embargo, se sabe que una buena parte de estos compuestos facilitan la generación de especies reactivas del oxígeno (Kim y cols., 2004; Gonzalez, Arancibia, Cáceres, Martínez y Smith, 2009), lo que permitiría sugerir algunos posibles mecanismos. El hecho de que el efecto del CHC sobre la viabilidad de FGH se manifieste con una distribución gaussiana, donde el punto intermedio representa precisamente la concentración donde se registra un aumento en la viabilidad celular,

da pie para pensar que el CHC, a estas concentraciones, actuaría como una señal de alerta ante una injuria subletal que podría estar activando un mecanismo de supervivencia celular.

### **7.3 Efectos de nicotina y CHC sobre migración celular.**

Un aspecto relevante de este estudio fue la determinación del efecto diferencial que presenta el CHC sobre los fenómenos de migración e invasión celular. En el ensayo de cierre de heridas en monocapa, los FGH mostraron una elevada capacidad de migración en presencia de concentraciones bajas y medias de CHC. En contraste, esta migración fue inhibida fuertemente a la concentración más alta. El hecho destacable es que, a las concentraciones equivalentes de nicotina, este efecto no fue observado, toda vez que la nicotina ejerció un efecto potenciador de la migración celular a todas las concentraciones observadas. Este patrón de comportamiento fue igualmente observado al analizar el efecto de estos compuestos sobre la migración tridimensional en el modelo de nidos de colágeno. Estas observaciones fueron refrendadas además en el modelo de invasión celular en el sistema bicameral.

Es interesante que estudios previos que han utilizado nicotina sobre FGH han mostrado que este agente puede disminuir la migración celular entre 0,1-1mM (Fang y Svoboda, 2005b). Este rango de concentración es equivalente a 0,35-3,5 mg/mL de CHC. Bajo la perspectiva de nuestro estudio, a estos valores de exposición a nicotina, las células ya habrían sido seriamente dañadas por el CHC, lo que pone en duda la relevancia fisiológica de estos hallazgos.

Es interesante destacar que FGH expuestos a concentraciones de CHC entre 50 y 100 mg/mL manifestaron un estímulo en su capacidad de migración en modelos 2D, nido e invasión. Esta potenciación de la migración e invasión celular podría estar relacionada con el estímulo que tienen los componentes del CHC sobre la expresión de uPA y MMPs (Kim, Liu, Kohyama, Kobayashi, Conner, Abe, Fang, Wen y Rennard, 2004; La Rocca y cols., 2007; Gonzalez, Arancibia, Cáceres, Martínez y Smith, 2009). En estudios futuros esperamos confirmar estos datos.

#### **7.4 Efectos de nicotina y CHC sobre diferenciación de miofibroblastos.**

El estudio de la viabilidad de FGH expuestos a CHC durante 72 horas, arrojó el resultado que se muestra en la Figura 17. Se observa que a partir de 125  $\mu\text{g/mL}$  de CHC, la viabilidad comienza a decaer significativamente. Por esta razón, se argumentó delimitar esta parte del trabajo en este punto y utilizar la concentración precedente de 100  $\mu\text{g/mL}$  como la dosis más alta que no alteró la viabilidad. Se decidió analizar la producción de la proteína marcadora de la diferenciación miofibroblástica como  $\alpha\text{-SMA}$  (Hinz y cols., 2007), por Western-Blot utilizando TGF- $\beta$ 1 como inductor de esta diferenciación. Nuestros resultados mostraron que a concentraciones equivalentes de CHC y nicotina, sólo CHC disminuyó de manera significativa la expresión de  $\alpha\text{-SMA}$  (Fang y Svoboda, 2005b).

Como ha sido reportado en estudios previos, el equilibrio de los factores que participan en la reparación tejidos es un concepto clave para entender el efecto de agentes externos sobre este proceso (Morimoto y cols., 1997). El desarrollo de fibrosis en pacientes fumadores con EP (Takeiuchi y cols., 2010) sugiere que en esta patología el equilibrio de los procesos de destrucción y regeneración de tejidos se encuentra fuertemente alterado. En particular, la alteración del balance redox en tejidos es capaz de modular la expresión de una gran variedad de moléculas proinflamatorias y del sistema inmune, como NF- $\kappa$ B o AP-1 (Rahman y cols., 1996). Es aquí donde, recientemente, se ha comenzado a poner un énfasis más serio sobre el rol de ROS sobre el proceso de reparación de tejidos (Werner y cols., 2003).

El control de la actividad de ROS se lleva a cabo mediante la síntesis y acumulación de especies antioxidantes en el tejido, por lo que estima que la presencia de una gran cantidad de ROS puede crear un fuerte desbalance en este equilibrio (Siwik y cols., 2001). Se ha propuesto que la periodontitis podría estar asociada a una baja capacidad antioxidante a nivel local (Brock y cols., 1994). Dado que un gran porcentaje de los compuestos del material particulado del CHC son precisamente especies oxidativas (Chen y cols., 2008; College of Agriculture, 2009), la asociación del progreso de la enfermedad periodontal con el tabaquismo parece ser una proyección interesante.

En conjunto, los resultados del presente estudio contribuyen a esclarecer los efectos celulares y funcionales del humo de tabaco y sus componentes en respuestas relacionadas con la reparación de tejidos gingivales humanos. Creemos que este conocimiento es fundamental para el mejor entendimiento de los efectos clínicos del tabaquismo sobre los tejidos bucales y en particular sobre la enfermedad periodontal y la respuesta al tratamiento de esta patología.

## **8. Conclusiones.**

- 1.** El CHC es capaz de estimular la viabilidad celular a concentraciones bajas (10-50  $\mu\text{g/mL}$ ), y disminuirla a concentraciones mayores ( $>200 \mu\text{g/mL}$ ). En el caso de nicotina, la viabilidad celular no se ve alterada.
- 2.** El CHC es capaz de estimular la migración e invasión celular a concentraciones bajas (50-100  $\mu\text{g/mL}$ ), e inhibir esta respuesta a concentraciones mayores ( $\mu\text{g/mL}$ ). La nicotina, a su vez, puede estimular la migración e invasión celular en todo el rango de concentraciones evaluadas.
- 3.** El CHC, y no la nicotina, disminuye significativamente la expresión del marcador de miofibroblastos  $\alpha$ -SMA.

## **9. Bibliografía.**

Bartold, P. M., McCulloch, C. A., Narayanan, A. S., y Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol.* 2000 *24*, 253-69.

Bartold, P. M., y Narayanan, A. S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol.* 2000 *40*, 29-49.

Behm, F. M., Levin, E. D., Lee, Y. K., y Rose, J. E. (1990). Low-nicotine regenerated smoke aerosol reduces desire for cigarettes. *J Subst Abuse* *2*, 237-47.

Benatti, B. B., César-Neto, J. B., Gonçalves, P. F., Sallum, E. A., y Nociti, F. H. (2005). Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur. J. Oral Sci* *113*, 400-3.

Bergström, J. (2003). Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J. Clin. Periodontol* *30*, 107-13.

Brock, G. R., Butterworth, C. J., Matthews, J. B., y Chapple, I. L. (2004). Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J. Clin. Periodontol* *31*, 515-21.

Carnevali, S., Nakamura, Y., Mio, T., Liu, X., Takigawa, K., Romberger, D. J., Spurzem, J. R., y Rennard, S. I. (1998). Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am. J. Physiol* *274*, L591-8.

Carvalho, M. D., Benatti, B. B., César-Neto, J. B., Nociti, F. H., da Rocha Nogueira Filho, G., Casati, M. Z., y Sallum, E. A. (2006). Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *J. Periodontol* *77*, 599-605.

Chang, Y. C., Hsieh, Y. S., Lii, C. K., Huang, F. M., Tai, K. W., y Chou, M. Y. (2003). Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J. Periodont. Res* *38*, 44-50.

Chapple, I. L., y Matthews, J. B. (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol.* 2000 *43*, 160-232.

Chen y Jinguo. (2008). "toxicological Analysis Of Low-nicotine And Nicotine-free Cigarettes". *Toxicology* *249*:194-203.

Chen, H. W., Lii, C. K., Ku, H. J., y Wang, T. S. (2009). Cigarette smoke extract induces expression of cell adhesion molecules in HUVEC via actin filament reorganization. *Environ. Mol. Mutagen* *50*, 96-104.

College of Agriculture, R. (2009). *The Reference Cigarette*.

- Cáceres, M., Hidalgo, R., Sanz, A., Martínez, J., Riera, P., y Smith, P. C. (2008). Effect of platelet-rich plasma on cell adhesion, cell migration, and myofibroblastic differentiation in human gingival fibroblasts. *J. Periodontol* 79, 714-20.
- César-Neto, J. B., Benatti, B. B., Sallum, E. A., Casati, M. Z., y Nociti, F. H. (2006). The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J. Periodont. Res* 41, 118-23.
- Desmoulière, A. (1995). Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol. Int* 19, 471-6.
- Erdemir, E. O., Duran, I., y Haliloglu, S. (2004). Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol* 31, 99-104.
- Fang, Y., y Svoboda, K. K. (2005a). Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. *J. Clin. Periodontol* 32, 1200-7.
- Fang, Y., y Svoboda, K. K. (2005b). Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. *J. Cell. Biochem* 95, 1108-19.
- Gamal, A. Y., y Bayomy, M. M. (2002). Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J. Clin. Periodontol* 29, 763-70.
- Gamberino, W. C., y Gold, M. S. (1999). Neurobiology of tobacco smoking and other addictive disorders. *Psychiatr. Clin. North Am* 22, 301-12.
- Gamonal, J. A., Lopez, N. J., y Aranda, W. (1998). Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int Dent J* 48, 96-103.
- Gao, S., Chen, K., Zhao, Y., Rich, C. B., Chen, L., Li, S. J., Toselli, P., Stone, P., y Li, W. (2005). Transcriptional and posttranscriptional inhibition of lysyl oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts. *Toxicol. Sci* 87, 197-203.
- Giannobile, W. V. (2008). Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J. Periodontol* 79, 1592-600.
- Giannopoulou, C., Geinoz, A., y Cimasoni, G. (1999). Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J. Clin. Periodontol* 26, 49-55.
- Goldberg, M. T., Han, Y. P., Yan, C., Shaw, M. C., y Garner, W. L. (2007). TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J. Invest. Dermatol* 127, 2645-55.
- Gonzalez, R., Arancibia, R., Cáceres, M., Martínez, J., y Smith, P. C. (2009). Cigarette smoke condensate stimulates urokinase production through the generation of reactive oxygen species and activation of the mitogen activated protein kinase pathways in human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res* 44, 386-94.

- Graswinckel, J. E., van der Velden, U., van Winkelhoff, A. J., Hoek, F. J., y Loos, B. G. (2004). Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J. Clin. Periodontol* 31, 562-8.
- Grinnell, F., Rocha, L. B., Iucu, C., Rhee, S., y Jiang, H. (2006). Nested collagen matrices: a new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions. *Exp. Cell Res* 312, 86-94.
- Grossi, S. G., Genco, R. J., Machtei, E. E., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R., Zambon, J. J., y Hausmann, E. (1995). Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J. Periodontol* 66, 23-9.
- Gullihorn, L., Karpman, R., y Lippiello, L. (2005). Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma* 19, 17-22.
- Hausmann, E., Finkelman, R. D., y Wikesjö, U. M. (1992). Periodontal breakdown: a result of inadequate repair?. *J. Periodontol* 63, 58-60.
- Hill, P., y Marquardt, H. (1980). Plasma and urine changes after smoking different brands of cigarettes. *Clin. Pharmacol. Ther* 27, 652-8.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., y Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol* 170, 1807-16.
- Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol* 127, 526-37.
- Häkkinen, L., Uitto, V. J., y Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol.* 2000 24, 127-52.
- James, J. A., Sayers, N. M., Drucker, D. B., y Hull, P. S. (1999). Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontol* 70, 518-25.
- Johnson, G. K., y Guthmiller, J. M. (2007). The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol.* 2000 44, 178-94.
- Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Tanaka, H., Suzuki, N., Kitami, S., Morita, T., Motohashi, M., y Maeno, M. (2009). Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch. Oral Biol* 54, 146-55.
- Kim, H., Liu, X., Kohyama, T., Kobayashi, T., Conner, H., Abe, S., Fang, Q., Wen, F. Q., y Rennard, S. I. (2004). Cigarette smoke stimulates MMP-1 production by human lung fibroblasts through the ERK1/2 pathway. *COPD* 1, 13-23.
- Koide, M., Nishizawa, S., Yamamoto, S., Yamaguchi, M., Namba, H., y Terakawa, S. (2005). Nicotine exposure, mimicked smoking, directly and indirectly enhanced protein kinase C activity in isolated canine basilar artery, resulting in enhancement of arterial contraction. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 292-301.

- Kyerematen, G. A., Damiano, M. D., Dvorchik, B. H., y Vesell, E. S. (1982). Smoking-induced changes in nicotine disposition: application of a new HPLC assay for nicotine and its metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther* 32, 769-80.
- La Rocca, G., Anzalone, R., Magno, F., Farina, F., Cappello, F., y Zummo, G. (2007). Cigarette smoke exposure inhibits extracellular MMP-2 (gelatinase A) activity in human lung fibroblasts. *Respir. Res* 8, 23.
- Labriola, A., Needleman, I., y Moles, D. R. (2005). Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol.* 2000 37, 124-37.
- Lahmouzi, J., Simain-Sato, F., Defresne, M. P., De Pauw, M. C., Heinen, E., Grisar, T., Legros, J. J., y Legrand, R. (2000). Effect of nicotine on rat gingival fibroblasts in vitro. *Connect. Tissue Res* 41, 69-80.
- Larjava, H., Heino, J., Kähäri, V. M., Krusius, T., y Vuorio, E. (1989). Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. *J. Dent. Res* 68, 20-5.
- Laviolette, S. R., y van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat. Rev. Neurosci* 5, 55-65.
- Liu, Y. F., Ge, X., Wen, L. Y., y Wang, X. J. (2010). Targeting nicotinic acetylcholine receptor to treat smoking-related periodontitis. *Medical hypotheses*.
- Luppi, F., Aarbiou, J., van Wetering, S., Rahman, I., de Boer, W. I., Rabe, K. F., y Hiemstra, P. S. (2005). Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione. *Respir. Res* 6, 140.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Martinez-Canut, P., Lorca, A., y Magán, R. (1995). Smoking and periodontal disease severity. *J. Clin. Periodontol* 22, 743-9.
- Martins, A. G., Andia, D. C., Sallum, A. W., Sallum, E. A., Casati, M. Z., y Nociti Júnior, F. H. (2004). Smoking may affect root coverage outcome: a prospective clinical study in humans. *J. Periodontol* 75, 586-91.
- Morimoto, Y., Tsuda, T., Nakamura, H., Hori, H., Yamato, H., Nagata, N., Higashi, T. (1997). "expression Of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors Of Metalloproteinases, And Extracellular Matrix Mrna Following Exposure To Mineral Fibers And Cigarette Smoke In Vivo". *Environ. Health Perspect* 105 Suppl 5:1247-51.
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J., y Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol.* 2000 14, 216-48.

- Page, R. C., y Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest* 34, 235-49.
- Powell, D. W. (2000). Myofibroblasts: paracrine cells important in health and disease. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc* 111, 271-92; discussion 292-3.
- Pozo, P., Valenzuela, M. A., Melej, C., Zaldívar, M., Puente, J., Martínez, B., y Gamonal, J. (2005). Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J. Periodont. Res* 40, 199-207.
- Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K., y MacNee, W. (1996). Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 154, 1055-60.
- Raulin, L. A., McPherson, J. C., McQuade, M. J., y Hanson, B. S. (1988). The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J. Periodontol* 59, 318-25.
- Russell, M. A., Wilson, C., Patel, U. A., Feyerabend, C., y Cole, P. V. (1975). Plasma nicotine levels after smoking cigarettes with high, medium, and low nicotine yields. *Br Med J* 2, 414-6.
- Ryder, M. I. (2007). The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol.* 2000 43, 267-77.
- Saldanha, J. B., Pimentel, S. P., Casati, M. Z., Sallum, E. A., Barbieri, D., Moreno, H. J., y Nociti, F. H. (2004). Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J. Periodontol* 75, 565-71.
- San Miguel, S. M., Opperman, L. A., Allen, E. P., Zielinski, J., y Svoboda, K. K. (2010a). Antioxidants counteract nicotine and promote migration via RacGTP in oral fibroblast cells. *J. Periodontol* 81, 1675-90.
- San Miguel, S. M., Opperman, L. A., Allen, E. P., Zielinski, J., y Svoboda, K. K. (2010b). Antioxidants counteract nicotine and promote migration via RacGTP in oral fibroblast cells. *J. Periodontol* 81, 1675-90.
- Schaffer, C. J., y Nanney, L. B. (1996). Cell biology of wound healing. *Int. Rev. Cytol* 169, 151-81.
- Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Aguillon, J. C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R., y cols. (2008). Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J. Clin. Periodontol* 35, 206-14.
- Smith, P. C., Muñoz, V. C., Collados, L., y Oyarzún, A. D. (2004a). In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J. Periodont. Res* 39, 87-92.

- Smith, P. C., Santibañez, J. F., Morales, J. P., y Martinez, J. (2004b). Epidermal growth factor stimulates urokinase-type plasminogen activator expression in human gingival fibroblasts. Possible modulation by genistein and curcumin. *J. Periodont. Res* 39, 380-7.
- Snyder, H. B., Caughman, G., Lewis, J., Billman, M. A., y Schuster, G. (2002). Nicotine modulation of in vitro human gingival fibroblast beta1 integrin expression. *J. Periodontol* 73, 505-10.
- Strietzel, F. P., Reichart, P. A., Kale, A., Kulkarni, M., Wegner, B., y Kuchler, I. (2007). Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol* 34, 523-44.
- Söder, B. (1999). Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol. Scand* 57, 77-82.
- Takeuchi, H., Kubota, S., Murakashi, E., Zhou, Y., Endo, K., Ng, P. S., Takigawa, M., y Numabe, Y. (2010). Nicotine-induced CCN2: from smoking to periodontal fibrosis. *J. Dent. Res* 89, 34-9.
- Tanur, E., McQuade, M. J., McPherson, J. C., Al-Hashimi, I. H., y Rivera-Hidalgo, F. (2000). Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J. Periodontol* 71, 717-22.
- Tipton, D. A., y Dabbous, M. K. (1995). Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol* 66, 1056-64.
- Tomar, S. L., y Asma, S. (2000). Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Periodontol* 71, 743-51.
- Tundulawessa, Y., Yongchaiyud, P., Chuttrthong, W., y Tundulawessa, K. (2010). The bioequivalent and effect of nicotine formulation gum on smoking cessation. *J Med Assoc Thai* 93, 574-9.
- Werner, S., y Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev* 83, 835-70.
- Wong, L. S., y Martins-Green, M. (2004). Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair Regen* 12, 471-84.
- Zhang, W., Song, F., y Windsor, L. J. (2009). Cigarette smoke condensate affects the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res* 44, 704-13.
- Zhou, J., Olson, B. L., y Windsor, L. J. (2007). Nicotine increases the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res* 42, 228-35.