

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA

*“Efecto del H₂O₂ sobre la actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular
con actividad osteolítica y la vía de señalización NFκB en fibroblastos del ligamento
periodontal humano.”*

Constanza Osorio Alfaro

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos
TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dr. Guillermo Díaz Araya
Dra. Inga San Martín Peñaloza
FINANCIAMIENTO
FONDECYT 1090461

Santiago-Chile
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el(a) candidato(a)

Nombre del Alumno(a)

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención en examen rendido el

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Nombre Evaluador

Nombre Evaluador

Nombre Evaluador

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN
PERIODONTOLOGÍA

“Efecto del H₂O₂ sobre la actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular con actividad osteolítica y la vía de señalización NFκB en fibroblastos del ligamento periodontal humano.”

Constanza Osorio Alfaro

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Guillermo Díaz Araya

Dra. Inga San Martín Peñaloza

FINANCIAMIENTO

FONDECYT 1090461

Santiago-Chile

2012

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia; mi mamá María Eugenia, mi papá Rafael, mis abuelos Inés y Gustavo, a mis amigos, pero principalmente a mi marido Alfonso por el apoyo constante, el amor incondicional, la paciencia inagotable y la compañía, que me permitieron completar y disfrutar este camino.

Agradecimientos

Gracias a la Dra. Marcela Hernández, por entregarme 3 años de oportunidades, aprendizaje y paciencia que me ayudaron a crecer y convertirme en una persona más completa. A los(as) Doctores(as) Guillermo Díaz e Inga San Martín por compartir generosamente su conocimiento y consejo a través de ésta investigación y a todos los miembros del laboratorio de biología periodontal y al laboratorio de toxicología y farmacología, principalmente a Leslie Henríquez y Jocelyn García por la ayuda entregada. Además, agradezco a Franco Cavalla, Fabián Obregón, Loreto Abusleme y Verónica Mundi por el cariño, apoyo y compañerismo que compartimos en este viaje. Quiero agradecer también, a los Dres. Jorge Gamonal, Nora Silva, Andrea Dezerega y Nicolás Dutzan por su consejo y guía permanente. Finalmente quiero agradecer al departamento de Cirugía por la asistencia invaluable en esta investigación y a los docentes que participaron en mi formación a lo largo del Magister, por entregarme conocimientos y vivencias nuevas que ampliaron mi visión de la ciencia y la salud.

Abreviaciones

FLP	Fibroblastos de ligamento periodontal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
NFκB	Factor nuclear de transcripción κ B
% A	Porcentaje de Activación
PAa	Periodontitis apical asintomática
GP	Granuloma periapical
QRI	Quiste radicular inflamatorio
IL-1β	Interleuquina 1β
RANKL	Receptor activador del factor nuclear κ B
INF-β	Interferón β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TLR-1	Receptor tipo Toll 1
CD14	Cluster de diferenciación 14
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
ERK	Kinasa regulada extracelularmente
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógeno
JNK	Kinasa c-jun n-terminal
PMN	Polimorfo nuclear neutrófilo
FCG	Fluido crevicular gingival
TIMPS	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dubecco
SBF	Suero fetal bovino
BSA	Albúmina de suero bovina
h	horas

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), entre ellas H_2O_2 , son liberadas durante la inflamación crónica inducen la destrucción tisular por medio de la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias y la activación de metaloproteinasas de matriz (MMP), en ocasiones involucrando la activación de la vía de señalización $NF\kappa B$. Si bien, los fibroblastos del ligamento periodontal (FLP) regulan la homeostasis del periodonto, no se conoce el efecto de las ERO sobre la síntesis y actividad de las MMPs y las vías de señalización involucradas.

Objetivo: Evaluar la actividad de MMPs -2 y -9 en conjunto con la participación de la vía $NF\kappa B$ en cultivos primarios de FLP humano tratados o no con dosis subletales de H_2O_2 .

Metodología: FLP fueron aislados y cultivados a partir de 14 terceros molares sanos de 14 sujetos con indicación de extracción y expuestos a dosis subletales de peróxido. La activación de $NF\kappa B$ se determinó mediante la translocación nuclear de la subunidad p65 en presencia de H_2O_2 y/o SN50, un péptido inhibidor de la subunidad p50 de la vía $NF\kappa B$ y controles respectivos mediante inmunofluorescencia. Los FLP fueron estimulados con dosis subletales de H_2O_2 (2,5-10 μM) por 24 h y/o SN50 como control negativo. Los sobrenadantes fueron recolectados y procesados. La actividad de las proformas y formas activas de MMP-2 y MMP-9 fueron determinadas mediante zimografías en gelatina y evaluadas por densitometría. Los resultados fueron

expresados como unidades arbitrarias densitométricas (ua) por mg de proteínas totales. Los resultados fueron analizados por medio del test estadístico ANOVA con el software StataV11.1.

Resultados: La viabilidad celular se mantuvo en los grupos estimulados con H₂O₂ en dosis de 2,5-10 µM por 24 h. El H₂O₂ indujo la translocación nuclear de NFκB. El porcentaje de activación (% A) de MMP-9 fue mayor en el grupo H₂O₂ 5 µM que en el grupo 5 µM/ SN50 (p=0,051); mientras que el % A de MMP-2, aumentó significativamente en el grupo H₂O₂ 5 µM comparado con el control. La actividad de MMP-9 fue significativamente mayor en el grupo H₂O₂ 2,5 µM comparado con el de 5 µM/ SN50 y el de 10 µM; mientras que la actividad de MMP-2 aumentó significativamente en el grupo de 5 µM en comparación con el grupo control, 10 µM y el grupo de 5 µM + SN50.

Conclusiones: La actividad gelatinolítica de MMP-2 aumenta con dosis subletales de H₂O₂ (<10 µM), en parte vía NFκB en FLP humano. La actividad de MMP-9 en FLP humano, está regulada parcialmente por la vía NFκB. El aumento en la actividad de MMP-2 inducido por H₂O₂, podría estar relacionado con la destrucción de tejido en las enfermedades periodontales.

Índice

INTRODUCCIÓN	10
MARCO TEÓRICO	14
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MATERIALES Y MÉTODO.....	36
RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	82
ANEXOS.....	83
BIBLIOGRAFÍA	85

Introducción

El periodonto está compuesto por el cemento radicular, ligamento periodontal, hueso alveolar y la unión dentogingival (1). El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado situado entre el cemento que cubre la raíz del diente y el hueso alveolar que tiene, entre otras funciones, dar apoyo a los dientes en sus alvéolos, otorgar resistencia frente a las fuerzas masticatorias, actuar como receptor sensorial y reservorio celular para la reparación y renovación tisular (1, 2). Los tipos celulares predominantes en los tejidos blandos del periodonto son los fibroblastos gingivales y los fibroblastos del ligamento periodontal (FLP). Estos juegan un rol central en la homeostasis de los tejidos periodontales y sus alteraciones patológicas (2).

Las principales patologías caracterizadas por la destrucción del tejido periodontal son la Periodontitis Crónica y la Periodontitis Apical Asintomática (PAa). Ambas se caracterizan por el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica inducida por agentes bacterianos, donde el fenómeno característico corresponde a la reabsorción ósea alveolar. Los eventos involucrados en la destrucción del periodonto implican una serie de interacciones complejas en el balance de mecanismos degradativos enzimáticos y no enzimáticos (3), tales

como la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ERO), y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs). Entre estas, las MMPs con actividad colagenolítica (MMPs -1, -8 y -13) y gelatinolítica (MMPs -2 y -9) degradan sinérgicamente el colágeno tipo I, principal componente de la matriz extracelular periodontal (4). En conjunto, estos mecanismos no sólo inducen la lisis bacteriana y activan a células del sistema inmune, sino que también provocan pérdida ósea y del ligamento periodontal (5-7).

Las ERO, tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), provienen principalmente de las células fagocíticas. Estos se acumulan en los sitios inflamados y causan alteraciones en los tejidos, y a nivel celular, involucrando el sistema de membranas celulares, proteínas y ADN (8).

Adicionalmente, las ERO pueden actuar como segundos mensajeros en algunas vías de señalización que median respuestas celulares como adhesión, proliferación, migración, apoptosis e inflamación, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (9-11). Existe un aumento creciente de evidencia que relaciona a las ERO con la destrucción tisular durante las enfermedades periodontales (8). Al respecto, se ha demostrado la existencia de un desbalance

en la actividad oxidante/antioxidante en pacientes con periodontitis crónica y apical a favor de un estado pro-oxidante (12, 13).

Los FLP constituyen una población celular heterogénea y normalmente expresan un fenotipo osteoblástico, que incluye una alta actividad fosfatasa alcalina (14). Sin embargo, bajo un ambiente proinflamatorio son capaces de cambiar su fenotipo hacia uno secretor de factores osteolíticos, tales como Interleuquina (IL) -1 β , Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κ B (RANKL) (15), y MMPs (3), y por otro lado, de reducir la actividad fosfatasa alcalina (15).

Evidencia reciente sustenta un rol de las ERO sobre la pérdida ósea mediante dos potenciales mecanismos: 1) Supresión de la formación ósea, mediante la inhibición de la diferenciación osteoblástica (16, 17) y 2) Estimulación la diferenciación osteoclástica y la reabsorción ósea mediante la inducción de RANKL y citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral - α (TNF- α), e inducción de la expresión y activación de MMPs (11, 18-20). Se ha reportado que las ERO pueden inhibir la diferenciación osteoblástica mediada por la vía Wnt/ β -catenina *in vitro* (17) y a la vez potenciar la secreción de mediadores inflamatorios osteolíticos (21). Particularmente, la exposición a

H₂O₂ aumenta la expresión y actividad de las MMPs osteolíticas -2, -9 y -13 en células epiteliales y fibroblastos (11); Se ha propuesto que el H₂O₂ puede actuar como segundo mensajero estimulando la fosforilación del complejo NFκB/IκB, que a su vez activa a NFκB, permitiendo la translocación nuclear y facilitando la unión de este factor de transcripción a promotores de genes de citoquinas proinflamatorias u osteolíticas, como IL-2, -6, -8, interferón-β (INF-β) y TNF-α (22). Adicionalmente, las ERO son capaces de inducir la expresión y activación de las MMPs osteolíticas como las MMPs-13, -2 y -9 (11, 18, 19, 23). Pese a la evidencia que vincula a las ERO con la destrucción ósea asociada a las enfermedades periodontales, hasta el momento no se ha evaluado el efecto de las ERO sobre los FLP, ni su relación con los niveles de MMPs osteolíticas.

Por este motivo, el propósito de este estudio es evaluar la actividad de MMPs -2 y -9 en conjunto con la participación de la vía NFκB en cultivos primarios de FLP humano tratados o no con H₂O₂.

Marco Teórico

1. Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es tejido conectivo especializado situado entre el cemento, que cubre la raíz del diente, y el hueso alveolar. Su grosor varía en espesor desde 0,15 hasta 0,38 mm. Es un tejido conjuntivo bien adaptado y su función principal es dar apoyo a los dientes en sus alvéolos y al mismo tiempo otorgar resistencia frente a la fuerza masticatoria. Además, tiene la capacidad de actuar como receptor sensorial para el correcto posicionamiento de la mandíbula durante la masticación. El ligamento periodontal es también un reservorio de células para la homeostasis de los tejidos periodontales durante la reparación y renovación tisular (1, 2).

El ligamento periodontal está formado por una población heterogénea de células que incluyen osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos, restos epiteliales de Malassez, monocitos, macrófagos, células mesenquimales indiferenciadas, cementoblastos y odontoclastos, y un compartimiento extracelular compuesto predominantemente por matriz extracelular colágena (1).

Los tipos celulares predominantes de los tejidos blandos del periodonto son los fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal. Estos juegan un rol central en el funcionamiento normal del periodonto y en alteraciones patológicas, siendo responsables de la síntesis y recambio de la matriz extracelular del tejido periodontal (14, 24). Aunque ambos comparten una morfología fusada, expresión de vimentina y síntesis de colágeno y fibronectina, existen diferencias cualitativas y cuantitativas en su tasa de producción de colágeno, proteínas de matriz extracelular, actividad fosfatasa alcalina y respuesta a patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis*, indicando que poseen funciones distintas (24, 25). Variados estudios en cultivos celulares derivados de ligamento periodontal humano han demostrado que los FLP poseen propiedades heterogéneas con características tipo fibroblasto y tipo osteoblasto (24, 26). El fenotipo osteoblástico de los FLP se evidencia en la alta actividad de la enzima fosfatasa alcalina, sensibilidad a la hormona paratiroidea, producción de osteocalcina y formación de nódulos de fosfato de calcio (14).

Los FLP son capaces de diferenciarse en células de linaje osteoblástico o cementoblástico y por tanto son esenciales en la mantención de la integridad de los tejidos periodontales y su recambio (15). Recientemente, se han descrito marcadores fenotípicos de FLP como periostina, Runx2 (27), proteína de unión

a cemento (28), molécula de adhesión neural-1 (NCAM-1) (29), proteína de cemento-23 (30), esclerotina (31), proteína asociada al ligamento periodontal (PLAP)-1/asporina (32), proteína específica del ligamento periodontal (PDLs-17) (14) y proteína de unión a calcio S100A4 (29), entre otros (14). Existe evidencia creciente que comprueba que las células residentes del periodonto de pacientes sanos o enfermos, responden de forma distinta a las bacterias patogénicas. FLP de pacientes con periodontitis presentaron una mayor expresión de RNA mensajero del receptor tipo Toll – 1 (TLR-1), -4, -17 y el cluster de diferenciación -14 (CD14) antes y después de la estimulación con *Porphyromonas gingivalis*. Además, pacientes que presentaron detección positiva de *Porphyromonas gingivalis* en sitios periodontales tuvieron una mayor respuesta *in vitro* de FLP frente a *Porphyromonas gingivalis* que los FLP de pacientes donde no se detectó (33).

Los procesos infecciosos crónicos en el periodonto inducen la activación de la respuesta inmunoinflamatoria, caracterizada por un balance pro-oxidante, síntesis de citoquinas proinflamatorias y MMPs osteolíticas como MMP-2 y -9, que pueden afectar el fenotipo de los FLP y su función (15). Se ha descrito que en presencia de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y MMPs colagenolíticas, tales como la MMP-13, los FLP sufren cambios fenotípicos,

pierden sus características tipo osteoblasto y expresan genes asociados a actividades catabólicas (25, 33-35).

2. Etiopatogenia de las enfermedades de los tejidos de soporte dentario.

Las enfermedades más prevalentes que afectan al tejido de soporte dentario corresponden a la periodontitis apical asintomática (PAa) y periodontitis crónica. La PAa es altamente prevalente en la población chilena, si bien no existen estudios epidemiológicos al respecto, se ha descrito que representan un 99,45 % de las biopsias de tejido periapical recibidas en el Instituto de Referencia de Patología Oral, IREPO, de la Universidad de Chile en el año 2005 (36). Su causa más frecuente corresponde a caries dental no tratada y conduce frecuentemente a la pérdida dentaria (37).

La PAa se inicia como una inflamación del ligamento periodontal apical y del tejido óseo circundante a causa de la colonización bacteriana y necrosis de la pulpa dentaria. Se caracteriza por la formación de una lesión periapical (LPA) que puede corresponder a un granuloma periapical (GP) o a un quiste radicular inflamatorio (QRI) (5, 38). El GP, histológicamente está compuesto por tejido de granulación, es decir infiltrado inflamatorio y tejido conjuntivo vascular. Si el estímulo inflamatorio persiste, puede gatillar la proliferación de los restos epiteliales de Malassez hasta formar un QRI, que está formado por una cavidad quística delimitada por epitelio (37). El infiltrado inflamatorio perirradicular

asociado a las LPAs contiene linfocitos T, B, plasmocitos, mastocitos, células Natural Killer y macrófagos; siendo éstos últimos fundamentales en el desarrollo de estas lesiones (39).

De modo similar a la PAa, la periodontitis crónica forma parte de un grupo heterogéneo de enfermedades inflamatorias de naturaleza infecciosa, cuyo agente etiológico principal es el biofilm bacteriano subgingival que coloniza el surco gingivo-dentario (40). En un estudio realizado en Chile el año 1996 se estimó que su prevalencia en la población adulta entre los 35 y los 44 años era de un 90,89 % y entre los 65 y los 74 años era de un 100 % (41). La periodontitis crónica es asintomática en estados iniciales, sin embargo su progresión lleva a la migración apical del epitelio de unión con formación de un saco periodontal y pérdida de tejido de soporte dentario, generando movilidad de los dientes y posterior pérdida dentaria (42). La periodontitis crónica está caracterizada por la destrucción de tejido de soporte dentario (hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular) y está modulada en parte por la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero (42).

En resumen, tanto en periodontitis crónica como en PAa, el infiltrado inflamatorio en conjunto con las células residentes del hospedero secretan mediadores inflamatorios, citoquinas, MMPs y ERO. Se sabe que estos

mediadores causan destrucción de los agentes bacterianos; sin embargo cuando la carga bacteriana sobrepasa la capacidad defensiva del hospedero y de los tejidos colindantes, inducen la destrucción del tejido de soporte dentario.

3. *Rol de las MMPs en la destrucción de los tejidos de soporte dentario.*

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de Zinc y Calcio que tienen como función principal la degradación de la mayoría de las proteínas de matriz extracelular durante la organogénesis, crecimiento y recambio normal del tejido. Son producidas en forma latente por numerosos tipos celulares que incluyen leucocitos, fibroblastos, osteoblastos, queratinocitos y células endoteliales. El desbalance en la expresión o actividad de las MMPs se ha relacionado con procesos patológicos asociados con la degradación excesiva de la matriz extracelular como la artritis reumatoide, enfermedades vasculares, periodontitis crónica (43) y PAa (38), entre otras.

Se han descrito 24 genes distintos que codifican para miembros de las MMPs y se clasifican según su estructura y especificidad de sustrato. La mayoría de las MMPs requieren de un dominio catalítico conservado que incorpora un propéptido para mantener su estado latente, un péptido señal que dirige su síntesis y un dominio hemopexina C-terminal que contribuye a la especificidad de sustrato y a las interacciones con sus inhibidores endógenos. Las MMPs se dividen en 6 grupos: colagenasas (MMPs -1, -8 y -13),

gelatinasas (MMPs -2 y -9), estromelinas (MMPs -3 y -10), matrilisinas (MMPs -7 y -26), MMP transmembrana (MT-MMPs -14, -15, -16 y -24) y otras (MMPs -12, -17, -19, -20, -22, -23, -25, -27) (44).

La regulación de las MMPs en los tejidos se da fundamentalmente a 3 niveles: transcripcional, activación proenzimática y a nivel de la inhibición de la actividad enzimática (45).

- Nivel transcripcional: A nivel transcripcional las MMPs son reguladas por una gran variedad de agentes que incluyen factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, productos oncogénicos, agentes químicos y ERO. El factor de crecimiento transformante - β (TGF- β), el ácido retinoico y los glucocorticoides son supresores de la expresión de MMPs. Las vías de transducción de señales involucradas en la regulación transcripcional de estas enzimas incluye a una kinasa regulada extracelularmente (ERK), y a una kinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) (46).
- Activación proenzimática: Para ser activadas, las MMPs requieren de la remoción proteolítica del propéptido amino-terminal o bien la modificación conformacional del prodominio y su posterior disociación en la interacción

Zn⁺²-cisteína (47). *In vitro*, la activación de las MMPs puede darse con agentes como tioles, compuestos mercuriales, ERO, agentes desnaturalizantes, pH elevado y altas temperaturas. *In vivo* las proenzimas son activadas por cascadas proteolíticas tisulares, plasmáticas o provenientes de bacterias oportunistas.

- Inhibidores: La activación proteolítica de las MMPs es regulada mediante inhibidores endógenos como la α -2 macroglobulina, que bloquea la actividad de estas enzimas en el plasma y fluidos corporales (48). También pueden ser inhibidas en forma específica por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) (4, 43) y por inhibidores exógenos o sintéticos como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y la 1,10 fenantrolilna, quelantes de Ca⁺² y Zn⁺² (49, 50).

Estudios recientes han demostrado que además de la degradación de matriz extracelular, las MMPs juegan un rol importante en la regulación de la respuesta inmune, ya que pueden procesar moléculas bioactivas, tales como receptores de membrana, citoquinas, hormonas, defensinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y otras MMPs (45). Debido a que el colágeno tipo I

corresponde al constituyente principal de la matriz extracelular periodontal, las MMPs con actividad colagenolítica (MMPs -1, -2, -8, -9 y -13) presentan un rol fundamental en la patogenia de las enfermedades periodontales. Entre las más importantes, se describen la MMP-8, -9 y -13, mientras que la MMP-1 se asocia más bien al recambio fisiológico de la matriz periodontal (4).

En las enfermedades periodontales se ha identificado un aumento de la expresión y actividad de MMPs -2 y -9, en conjunto con MMP-13. Estas MMPs están involucradas en la reabsorción ósea por mecanismos que aún no están claramente identificados (4, 51). Los productos de proteólisis de MMP-13 a partir del colágeno tipo I se desnaturalizan espontáneamente a gelatina a temperatura ambiente y son susceptibles a la degradación por las MMPs -2 y -9 (Gelatinasa A y B, respectivamente). MMP-2 (colagenasa tipo IV de 72 kDa, gelatinasa A) y MMP-9 (colagenasa tipo IV de 92 kDa, gelatinasa B) degradan el colágeno tipo IV, regulando la remodelación de las membranas basales y la degradación de gelatina luego del clivaje de las moléculas de colágeno por las colagenasas intersticiales (MMP-1, -13, -18) (52). Adicionalmente, se ha visto que la MMP-13 está involucrada en el inicio y progresión de la reabsorción ósea patológica (3, 53) y podría disminuir la diferenciación osteoblástica en conjunto con el fenotipo fosfatasa alcalina- mediada por osterix (Osx)(34).

Estudios previos han demostrado que los patógenos periodontales pueden mediar la degradación del tejido conectivo a través de la producción de antígenos que estimulan la producción de citoquinas por neutrófilos y macrófagos circulantes. Estas citoquinas pueden inducir la síntesis de MMPs en las células residentes de los tejidos periodontales iniciando la degradación tisular (54).

Las MMPs producidas por las células residentes e infiltrantes del periodonto pueden ser inducidas por IL-1 y EMMPRIN, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que tiene un efecto inductor de MMPs (55). En un estudio reciente, se observó que los FLP expresan niveles basales de RNA mensajero y de proteínas para MMP-2 e inductor extracelular de MMPs. Bajo estímulo directo de IL-1 β , la expresión de MMP-2 aumenta, sin la mediación del inductor extracelular de MMPs (56). Además se ha detectado que en cultivos tisulares de gíngiva inflamada hay mayores niveles y actividad de MMP-2 que en los de tejidos sanos (57).

En el caso de MMP-9, se ha detectado su presencia en el epitelio de unión y epitelio del saco periodontal, en los neutrófilos polimorfonucleares

(PMN) y en forma variable, en el tejido conectivo de sitios con enfermedad periodontal (58). También se ha observado un aumento en el fluido gingival crevicular (FCG) de pacientes con periodontitis crónica y se ha propuesto que la cascada de activación compuesta por las MMPs-2, -9 y -13 podría representar un mecanismo de amplificación de la destrucción periodontal durante la periodontitis crónica (59).

De modo similar se ha observado que los FLP humanos secretan MMP-2 y -9, y que MMP-2 puede ser sobreexpresada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e IL-1 α , sugiriendo que el aumento en la producción de MMP-2 en FLP estimulados con patógenos periodontales puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad periodontal (60).

4. Rol de las ERO en la destrucción de los tejidos de soporte dentario.

Las ERO son generadas como subproductos en los procesos metabólicos de todos los organismos aeróbicos (61). En condiciones fisiológicas, los sistemas de defensa antioxidantes protegen a la célula y a los tejidos del desbalance oxidativo. Cuando la generación de ERO excede la capacidad de los sistemas antioxidantes se produce daño a los constituyentes celulares como ADN, lípidos, proteínas y azúcares (61, 62).

Las ERO comprenden el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el óxido nítrico (NO^\cdot), y los derivados no radicales del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$). Estas se han asociado con la destrucción de tejidos de soporte dentario en las enfermedades periodontales (22). Los principales productores de ERO durante la periodontitis son los fagocitos activados; PMN y macrófagos producen grandes cantidades de ERO a través de la NADPH oxidasa (62), con el objetivo de eliminar los agentes bacterianos (22). Se ha reportado que los pacientes con enfermedades periodontales presentan un aumento del número y la actividad de los PMN (63). De modo similar, se ha visto que individuos con periodontitis crónica presentan

un incremento en la actividad de enzimas productoras de ERO (22). Patógenos periodontales como *Fusobacterium nucleatum* no sólo aumentan la producción intracelular de ERO en los PMN, sino que también su liberación extracelular (64). Otros estudios han demostrado que los PMN presentes en el FCG de pacientes con periodontitis crónica aumentan su producción de ERO en comparación con sujetos sanos (65, 66) y se han asociado los niveles de peroxidación lipídica causada por derivados del oxígeno con la intensidad de la inflamación y la destrucción tisular en FCG de pacientes con periodontitis crónica (67).

Se ha postulado que la actividad osteolítica de las ERO podría ejecutarse de dos formas: 1) la supresión de la formación ósea y diferenciación osteoblástica, y 2) la estimulación de la reabsorción ósea y diferenciación osteoclástica (11, 17). Por esto, la activación de los fagocitos durante los procesos inflamatorios podría jugar un papel clave en la pérdida de tejido de soporte periodontal.

Existe evidencia creciente que sugiere que las ERO y particularmente el H₂O₂, además de producir daño celular directo en células tipo osteoblastos y sus precursores, es capaz de inhibir la diferenciación osteoblástica mediada por

la vía Wnt/ β -catenina, y por tanto, la actividad de la fosfatasa alcalina y producción de colágeno en osteoblastos (18). Adicionalmente, se ha detectado que induce una reducción del factor osteoprotector osteoprotegerina (OPG) (16, 17, 68, 69).

El H_2O_2 también puede actuar como segundo mensajero estimulando la fosforilación del complejo NF κ B/I κ B, activando a NF κ B, permitiendo la translocación nuclear y facilitando la unión de este factor de transcripción a promotores de genes de citoquinas proinflamatorias u osteolíticas, tales como IL-2, -6, -8, interferón- β y TNF- α (Figura 1) (22). Estos, a su vez, inducen la producción de citoquinas como IL-1 β e IL-8 en FLP y fibroblastos gingivales tratados con LPS bacteriano (15, 35). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado un rol de las ERO como inductoras de la expresión y activación de MMPs osteolíticas, tales como MMPs-13, -2 y -9 (11, 18, 19, 23). Particularmente, IL-1 β y TNF- α , y MMPs pueden actuar sinérgicamente, inhibiendo la diferenciación osteoblástica y estimulando la osteoclastogénesis y reabsorción ósea. También se ha observado que el tratamiento con H_2O_2 aumenta la producción de IL-8 en FLP en concentraciones bajas proponiendo que en los FLP el H_2O_2 actúa como un inductor de IL-8 en bajas concentraciones y como un factor citotóxico a concentraciones superiores.

Además, se ha descrito que el H_2O_2 actúa, en parte, por medio de las vías de señalización ERK, MAPK y kinasa c-Jun N terminal (JNK) para la inducción de IL-8 en FLP (70).

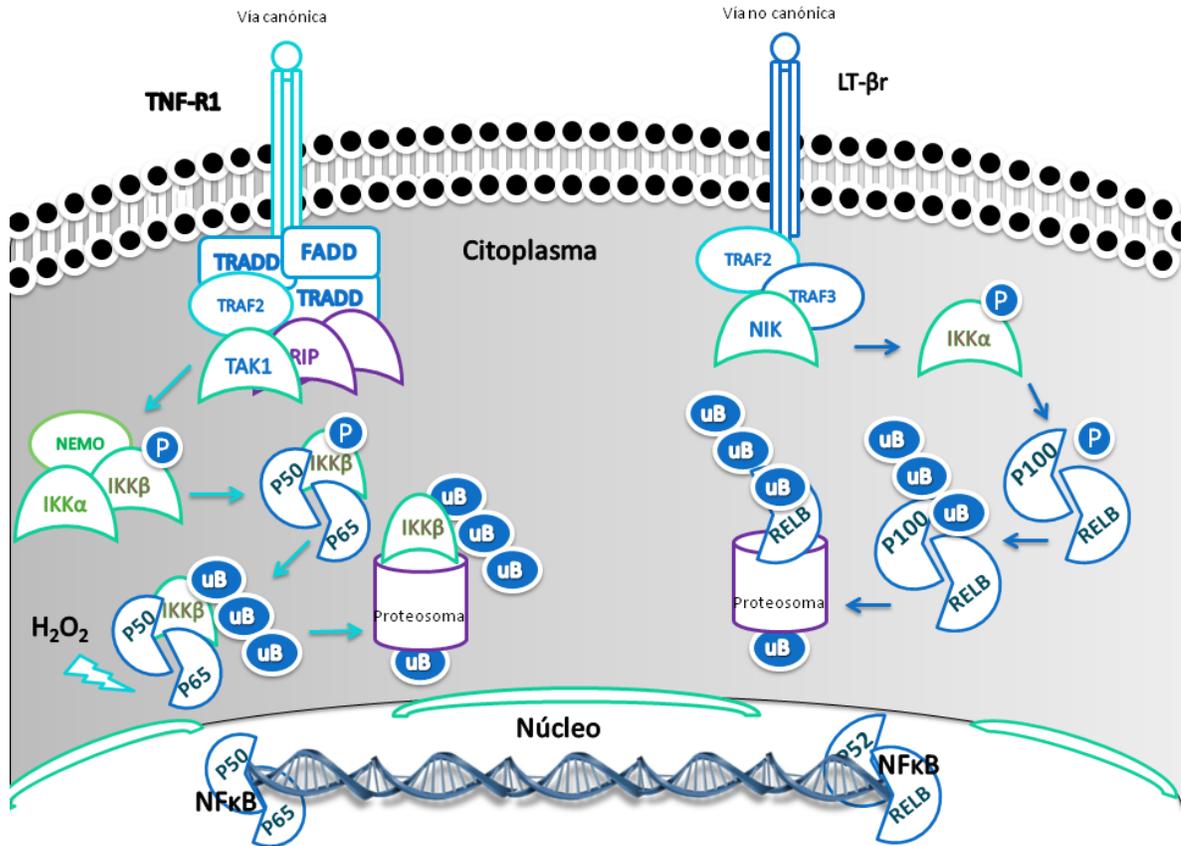


Figura 1: Diagrama de las vías canónica y no canónica de activación de NF κ B. Los dímeros de NF κ B se encuentran unidos a proteínas reguladoras I κ B, que secuestran los complejos inactivos al citoplasma. Distintos estímulos inducen la degradación de I κ B por medio de la fosforilación del complejo IKK (IKK α y β y la subunidad reguladora NEMO). I κ B fosforilado es ubiquitinado y posteriormente degradado, liberando así los dímeros de NF κ B para su translocación nuclear. La vía canónica es inducida por estímulos fisiológicos, mientras que la vía no canónica es inducida por algunas citoquinas de la familia TNF.

De modo similar a los osteoblastos, bajo un ambiente inflamatorio, los FLP son capaces de sintetizar citoquinas y MMPs osteolíticas e inhibir su fenotipo osteoblástico (3, 15). TNF- α , IL-1 β pueden disminuir la función osteogénica en FLP (15), y a su vez inducir aumentos en la expresión de MMP - 1, -3 y -13 (3, 71). Estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación de PMN por *Fusobacterium nucleatum* produce un aumento en la producción de ERO y con esto, la estimulación de la expresión de citoquinas osteolíticas como TNF- α , IL-1 β , IL-8 y RANKL (11).

Además, se ha observado que los fibroblastos gingivales estimulados con LPS, aumentan la producción de citoquinas inflamatorias y MMP-2 por medio del incremento en la producción de ERO. Así, la activación de las vías MAPK y JNK, relacionadas con el aumento de citoquinas y MMP-2 son reguladas por el estado oxidativo inducido por LPS, no así la vía NF κ B (72).

Debido a la asociación existente entre el estímulo producido por las ERO y la secreción y activación de MMPs osteolíticas en la patogenia de las enfermedades periodontales, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad de MMPs -2 y -9 en conjunto con la participación de la vía NF κ B en cultivos primarios de FLP humano tratados o no con H₂O₂.

Hipótesis

El H₂O₂ aumenta la actividad de las MMPs -2 y -9 en FLP humano, efecto mediado al menos en parte, vía NFκB.

Objetivo General

Evaluar la actividad de MMPs -2 y -9 en conjunto con la participación de la vía NFκB en cultivos primarios de FLP humano tratados o no con dosis subletales de H₂O₂.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar los cultivos primarios de FLP humano.
2. Determinar el efecto del H_2O_2 en función del tiempo y concentración sobre la viabilidad de los cultivos primarios de FLP humano.
3. Determinar el efecto del H_2O_2 sobre la activación de la vía de señalización $NF\kappa B$.
4. Determinar el efecto del H_2O_2 y de la inhibición de $NF\kappa B$ sobre la actividad de MMPs -2 y -9 en cultivos primarios de FLP.

Materiales y Método

1. Selección de los sujetos de estudio.

El estudio realizado fue de carácter experimental *in vitro*. Se obtuvieron cultivos primarios de FLP humano de pacientes que asistieron a la clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile en el período 2009-2010. Se incluyeron sujetos con indicación de extracción de terceros molares sanos. Los antecedentes generales y clínicos de los pacientes se registraron en una ficha clínica diseñada con este propósito (Anexo 1).

Los criterios de inclusión para los sujetos fueron:

- Pacientes con indicación de extracción de terceros molares sanos.
- Dientes erupcionados con formación radicular completa.
- Mayores de 18 años.
- Sistémicamente sanos

Los criterios de exclusión fueron:

- Tratamiento con antibióticos, y/o antiinflamatorios no esteroideos en los 3 meses previos al procedimiento.
- Embarazo.

En forma previa al procedimiento de extracción dentaria, los sujetos fueron informados sobre el estudio y firmaron un consentimiento informado. El protocolo de investigación fue aprobado previamente por el Comité institucional de Ética de la Facultad de Odontología Universidad de Chile y de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica CONICYT/FONDECYT (Anexo 2).

Se obtuvo el ligamento periodontal de 14 terceros molares de 14 pacientes. La muestra estuvo conformada por 10 mujeres y 4 hombres, mientras que el promedio de edad fue 23,5 años.

2. Obtención de FLP humanos.

La metodología de obtención y cultivo de FLP a partir de terceros molares se realizó según la técnica de explante (73). Luego de realizar las exodoncias, las muestras fueron lavadas dos veces con medio de biopsia estéril Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA) alto en glucosa y glutamina, suplementado con 100 UI/ml de penicilina (HyClone Laboratories Inc., South Logan, Utah, USA), 100 µg/ml de estreptomina (HyClone Laboratories Inc., South Logan, Utah, USA), 250 µg/ml de gentamicina, 5 µg/Lt de anfotericina (HyClone Laboratories Inc., South Logan, Utah, USA) y 10% de suero bovino fetal (SBF) (HyClone Laboratories Inc., South Logan, Utah, USA) por 30 segundos y se almacenaron en 4 ml de medio de biopsia. Posteriormente, en ambiente estéril, se extrajo el ligamento periodontal ubicado 3 mm bajo el límite amelo-cementario y 1 mm sobre el área apical. Este fue adherido a un cubre objeto circular de 25 mm en una placa petri de 35 mm, donde se agregó medio de biopsia para luego ser incubado en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Al cabo de 24 h el medio de biopsia fue sustituido por medio de cultivo (DMEM alto en glucosa y glutamina, suplementado con 100 UI/ml de penicilina,

100 mg/ml de estreptomicina, y 10% de SBF) y las placas fueron incubadas en las condiciones anteriormente expuestas. Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia se realizó la digestión del cultivo con tripsina (0.08% de tripsina y 0.04% de ácido etilendiaminotetracético [EDTA]; GIBCO, Invitrogen Co., Carsbald, California, USA) a pH 7,2 y se procedió a resembrar 2×10^5 células en nuevas placas petri de 100 mm. Se utilizaron cultivos primarios entre pasajes 6-7. Parte de las células y el sobrenadante obtenido se congelaron a -80°C para su posterior uso.

3. Caracterización de cultivos primarios de FLP humano.

3.1 Análisis citológico e inmunofluorescencia.

La caracterización de FLP se realizó mediante análisis morfológico, inmunofluorescencia y detección de la actividad de fosfatasa alcalina. Los aspectos morfológicos de los cultivos primarios de FLP se observaron en un microscopio con contraste de fases, donde se evaluó su morfología y tasa de crecimiento (Carl Zeiss Inc., Microimaging, Thornwood, New York, USA).

Para el análisis fenotípico mediante inmunofluorescencia, los extendidos celulares se fijaron en formaldehído al 4% por 15 min a 4°C, para luego permeabilizar las células con Tritón X-100 (GIBCO, Invitrogen Co., Carsbald, California, USA) al 0,2% por 5 minutos, bloqueando finalmente con BSA al 3% (GIBCO, Invitrogen Co., Carsbald, California, USA) a 4°C para evitar unión del anticuerpo a proteínas inespecíficas. Luego, los preparados fueron incubados toda la noche con anticuerpos monoclonales primarios diluidos en BSA 3% anti-vimentina 1:100 (Novocastra Lab. Ltd., New Castle, UK) y anti-periostina 1:100 (Merck KGaA, Calbiochem, Darmstadt, Alemania) para identificar FLP, y anti-pancito queratina 1:100 (Novocastra Lab. Ltd., New Castle, UK) para descartar

la presencia de células epiteliales. Al cabo de 24 h se agregó el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 448 (Sigma Aldrich Co., LLC, USA) en BSA al 3% por 2 h con azul de Hoestch (Sigma Aldrich Co., LLC, USA) para la tinción de núcleos y Rodamina Phalloidina (Sigma Aldrich Co., LLC, USA) para α -actina. Las placas fueron examinadas en un microscopio confocal (Carl Zeiss Inc., Microimaging, Thornwood, New York, USA).

3.2 Actividad fosfatasa alcalina de FLP.

La actividad de fosfatasa alcalina fue medida en FLP bajo estímulo de diferenciación osteoblástica, sin estímulo de diferenciación osteoblástica y en fibroblastos gingivales usando un ensayo comercial según las instrucciones del fabricante (Sensolite, ©AnaSpec, Inc. Fremont, California, USA). Este ensayo utiliza un anticuerpo que se une a la fosfatasa alcalina y la adición de un sustrato colorimétrico llamado p- nitrofenil fosfatasa (pNPP) que al ser desfosforilado vira a amarillo y puede ser leído a 405 nm. Los cultivos celulares fueron lavados con buffer Tris HCl a pH 9.2 y luego con buffer de permeabilización (Tris, $MgCl_2$ y digitonina) e incubados 10 minutos a 37°C. A continuación, se adicionó una solución de sustrato para fosfatasa alcalina (50

Mm de buffer Tris, 1 μ M MgCl₂ y 3 mg/ml de pNPP). Las células fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min en agitación constante y se determinó la absorbancia con un lector de ELISA a 405 nm. Los resultados fueron expresados en ng de pNPP metabolizado (actividad de fosfatasa alcalina).

3.21 Diferenciación osteoblástica

En forma previa a su utilización en las distintas condiciones experimentales, los cultivos primarios de FLP fueron desprovistos de suero por 24 h y mantenidos con medio DMEM sin color. Luego de 24 h las células fueron lavadas e incubadas en DMEM libre de suero con o sin 50 mg/ml de ácido ascórbico y 10 nM de dexametasona; este medio de cultivo osteogénico se sustituyó posteriormente cada 24 h. Tras 5 días se evaluó la morfología celular por medio de un microscopio óptico y se midió la actividad fosfatasa alcalina usando un ensayo comercial, según instrucciones del fabricante (Sensolyte, ©AnaSpec Inc., Freemont, California, USA).

4. Viabilidad celular y determinación de dosis-tiempo de exposición a peróxido de hidrógeno.

Para determinar la dosis y tiempo de exposición subletal con peróxido de hidrógeno en los cultivos primarios, FLP fueron sembrados a una densidad de 6×10^5 células por pocillo y tratados con distintas concentraciones de H_2O_2 (1-1000 μM) por 24, 48 y 96 h en DMEM con y sin SBF 10%. Luego de 24 o 48 h de tratamiento, el medio condicionado fue reemplazado por DMEM sin SBF por otras 24 h. La viabilidad celular se determinó por medio de la exclusión con Azul de Tripán y el ensayo comercial Celltiter 96 AQueus (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

4.1 *Azul de Tripán*

Esta técnica consiste en la discriminación visual en una cámara de Neubauer de células viables y no viables según el grado de penetración de la tinción azul de tripán en el citoplasma celular. Brevemente, las células fueron trispsinizadas mediante la técnica anteriormente descrita y resuspendidas en 10 ml de medio de cultivo. A partir de esta dilución se tomaron 400 μl del tubo de cultivo. Para determinar el número celular se tomaron 20 μl de suspensión y 20

µl de azul de tripán que se repitieron y depositaron en la cámara de Neubauer. En este punto se realizó el conteo de las células que mantuvieron sus características birrefringentes en el campo estudiado. Este procedimiento se repitió dos veces y se realizó un promedio del recuento obtenido, que por una fórmula simple se tradujo en células viables por ml de medio de cultivo.

4.2 Ensayo celltiter ®.

Este ensayo colorimétrico permite determinar el número de células viables por medio de los compuestos de tetrazolio [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3 - carboximetoxifenil) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, (MTS) y un reactivo de unión a electrones metasulfato fenazina (PMS). El MTS es reducido por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas que forman azul de formazán. El formazán es un producto soluble en medio de cultivo, que puede ser medido mediante espectrofotómetro a 490 nm directamente de una placa de 96 pocillos. Esta absorbancia es directamente proporcional a las células metabólicamente activas presentes en el cultivo.

Brevemente, los FLP fueron sembrados una densidad de 5×10^3 células en una placa de 96 pocillos en las distintas condiciones a evaluar.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas con la solución de tinción a 37° C en una atmósfera con 5 % de CO₂ por 4 h y luego se adicionó la solución de detención de la reacción. Al cabo de 1 h se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 492 nm corregida con 630 nm.

5. Translocación nuclear *NFκB*.

Para evaluar el efecto del H₂O₂ en la activación de la vía de NFκB, se determinó la localización celular de la subunidad p65 de NFκB en extendidos celulares mediante inmunofluorescencia. Las células fueron tratadas por 24 h con concentraciones subletales de H₂O₂ determinadas previamente (10, 5 y 2,5 μM por 24 h). Además se adicionó un control positivo correspondiente a LPS de *Escherichia coli* (Sigma Aldrich Co., LLC, USA) 2 μg/ml y se incluyeron los siguientes controles: sin adición de H₂O₂, con H₂O₂ (5 μM) más catalasa (Sigma Aldrich Co., LLC, USA) 100 UI/ml, con H₂O₂ (5 μM) más el péptido inhibidor de translocación de NFκB, SN50, a una concentración final de 18 μM según indicaciones del fabricante (Merk Bioscience, Calbiochem, Darmstad, Alemania) y LPS 2 μg/ml más SN50 18 μM.

Luego de 24 h las células se fijaron en formaldehído al 4% por 20 min a 4°C, para luego permeabilizar los extendidos celulares con glicina 100 μM por 10 min y Tritón X-100 al 0,1% por 10 minutos y se bloquearon con BSA al 3% a 4°C por 20 min para evitar unión del anticuerpo a proteínas inespecíficas. Los extendidos celulares se incubaron toda la noche con anticuerpos monoclonales primarios anti-p65 diluido en BSA 3% en una concentración 1:50 (Cell Signal

Technology, Inc., Beverly, MA, USA). Al cabo de 24 h se agregó el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 448 (Sigma Aldrich Co., LLC, USA) en BSA al 3% por 2 h con Rodamina Phalloidina 1:500 para α -actina (Sigma Aldrich Co., LLC, USA). Las placas se examinaron en un microscopio confocal (Carl Zeiss Inc., Microimaging, Thornwood, New York, USA).

6. Determinación de actividad de MMPs -2 y -9 y su asociación con la vía NFκB.

Para determinar el efecto del H₂O₂ en los niveles de actividad de MMPs, los FLP fueron sembrados a una densidad de 6 x 10⁵ células por pocillo. Tras lavar, las células se incubaron en DMEM con SFB 10% más H₂O₂ en las condiciones subletales determinadas (10, 5 y 2,5 μM por 24 h o con DMEM con SFB 10% sin H₂O₂). Para evaluar la influencia de la vía NFκB sobre la actividad de las MMPs -2 y -9 se utilizó además un control con H₂O₂ (5 μM) más la adición de SN50 18 μM, según indicaciones del fabricante. Luego de 24 h el medio condicionado fue reemplazado por DMEM sin SBF 10%. El medio obtenido fue recuperado y almacenado a -80° C hasta su análisis posterior. Con el sobrenadante obtenido se analizaron mediante zimografía en gelatina la actividad de la pro forma, forma activa y el porcentaje de activación (% A) de MMP-2 y -9. El porcentaje de activación se definió como la relación entre la actividad de la forma activa de la MMP versus la actividad de la sumatoria de la forma activa y la proforma. Los resultados se estandarizaron por μg de proteína.

6.1 Concentración de proteínas totales en los sobrenadantes de FLP

La concentración de proteínas totales fue establecida mediante la técnica de Bradford. Este método determina la concentración de proteínas totales de una muestra extrapolándola a partir de una curva de BSA, mediante un colorante hidrofóbico que en presencia de ácido fosfórico exhibe un color café y que al reaccionar con proteínas genera un color azul intenso. La absorbancia proyectada fue medida en un espectrofotómetro a 595 nm.

Brevemente, se determinó una curva inicial con distintas diluciones de albúmina BSA. Posteriormente, se tomaron 50 μl de cada muestra y 50 μl de PBS que se mezclaron con 900 μl de reactivo de Bradford y la reacción se analizó mediante espectrofotómetro a 595 nm. Las mediciones obtenidas fueron comparadas con la curva de BSA y se determinó la concentración de proteínas de cada muestra ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en base a la curva estándar.

6.2 Zimografía en gelatina

La actividad de las MMPs -2 y -9 y sus porcentajes de activación respectivos fueron analizados mediante zimografía en gelatina. Brevemente,

alícuotas de sobrenadantes del grupo experimental tratado con H_2O_2 y del grupo control se corrieron en geles SDS/PAGE de ABA al 10% en condiciones desnaturalizantes no reductoras, utilizando como sustrato gelatina 1 mg/ml. Tras la electroforesis los geles se lavaron 2 veces en Tritón X-100 al 2,5% para remover el SDS y se incubaron en tampón Tris 20 mM a pH 7.4 y $CaCl_2$ 5 mM para desarrollar la actividad enzimática. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 y desteñidos con solución de ácido acético 10% y metanol 20%. La actividad gelatinolítica fue detectada como bandas desteñidas o semitransparentes en un fondo azul.

6.3 *Análisis densitométrico.*

Los geles fueron escaneados y cuantificados utilizando el programa “Un-Scan-it Gel Automated Digitizing System” (Silk Scientific, Inc., Utha, USA). Se evaluaron las bandas gelatinolíticas correspondientes a las proformas y a las formas activas de las MMPs -2 y -9. Los valores de la densidad integrada fueron expresados en unidades arbitrarias correspondientes a unidades de densitométricas arbitrarias (ud)/ μ g de proteínas.

7 Análisis de los Resultados

El análisis de los resultados obtenidos fue realizado utilizando el software STATA v11. La distribución de la muestra fue determinada por medio del Test Shapiro Wilk. La viabilidad celular según suplementación con SBF 10% se analizó mediante Test T no pareado. Se utilizó la prueba ANOVA y análisis post-hoc de Bonferroni para comparar la actividad fosfatasa alcalina, viabilidad de FLP según concentración de peróxido y tiempo de tratamiento, concentración de proteínas totales y actividad de MMPs para los distintos grupos experimentales y controles con un nivel de significación $<0,05$.

Resultados

1. Caracterización de cultivos primarios de FLP humano

1.1 Caracterización morfológica y de proteínas del citoesqueleto

Se obtuvieron células de morfología fusada tipo fibroblasto que no demostraron inhibición del crecimiento al contacto. Mediante inmunofluorescencia se demostró inmunopositividad para vimentina, α -actina, periostina; por lo tanto las células cultivadas fueron consideradas compatibles con FLP. Además, hubo inmunonegatividad para pancitoqueratina. De este modo se descartó contaminación con células epiteliales (Figura 2).

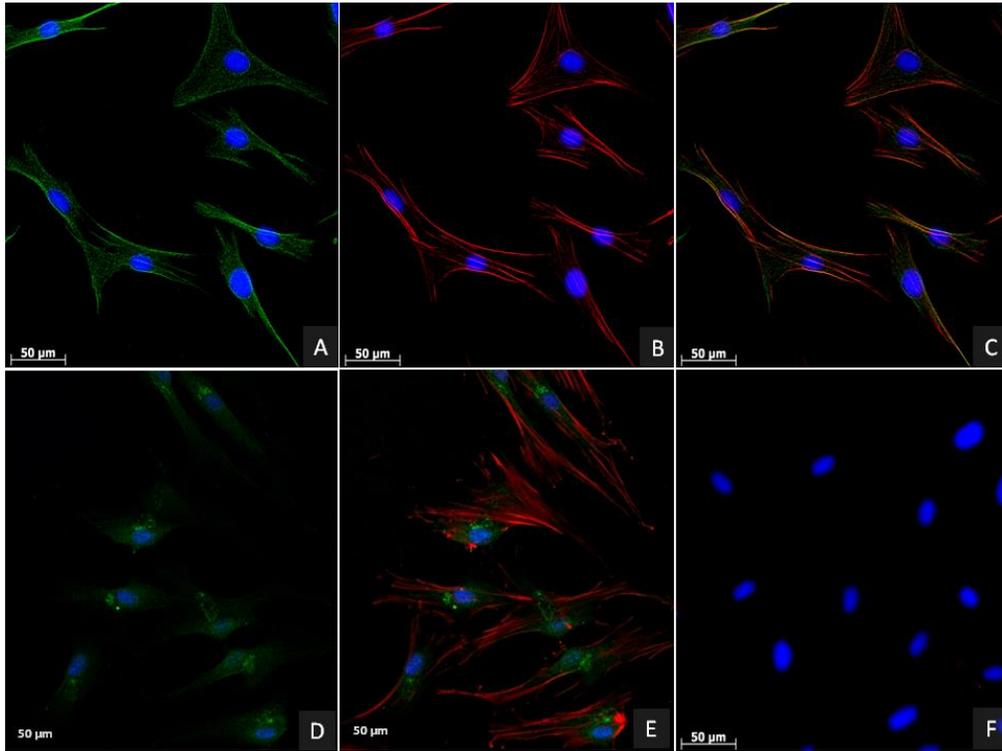


Figura 2. Caracterización fenotípica de FLP. Localización de (A) vimentina, (B) α -actina, (C) colocalización de vimentina y α -actina, (D) periostina, (E) colocalización de periostina y α -actina y (F) pancitoqueratina en FLP.

1.2. Actividad fosfatasa alcalina en FLP.

Se detectó actividad fosfatasa alcalina en fibroblastos gingivales y FLP con/sin inducción osteoblástica. Al comparar la actividad fosfatasa alcalina entre los grupos analizados, la mayor actividad se observó en FLP con inducción osteoblástica mientras que se detectó una tendencia hacia una mayor actividad de fosfatasa alcalina basal en FLP que en fibroblastos gingivales; aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1: Actividad de fosfatasa alcalina en FLP y fibroblastos gingivales.

	FLP con inducción osteoblástica (n=3)	FLP sin inducción osteoblástica (n=3)	Fibroblastos gingivales (n=3)	p
pNPP metabolizado (ng pNPP/ml)	9,92 ± 0,33	5,56 ± 3,66	2,49 ± 2,32	0,078

Valores expresados como promedio ± DS.

2. Efecto del H₂O₂ en función del tiempo y de la concentración en la viabilidad de los cultivos primarios de FLP humanos

Se evaluó la influencia de la presencia de suero bovino fetal 10% (SBF 10%) sobre la viabilidad de los FLP expuestos a H₂O₂ (100, 10 y 1 µM por 24 h) y controles no expuestos y se observó mayor viabilidad en presencia de SBF 10% en controles no expuestos a H₂O₂ (p=0,0536) (Figura 3 A), y FLP expuestos a H₂O₂ 1 µM (p=0,0005); mientras que a los 10 µM no se observaron diferencias entre los grupos, sino una tendencia a la reducción de la viabilidad general, que alcanzó el 100% en concentraciones de peróxido de 100 µM. En base a estos resultados se determinó que las condiciones de exposición a peróxido se realizarían con DMEM SBF 10%.

En relación al tiempo de exposición a H₂O₂, se realizó una curva de viabilidad preliminar con H₂O₂ en concentraciones de 1, 10, 5, 2,5 y 50 µM por 24 h y 48 h. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los grupos respectivos expuestos a H₂O₂ entre las 24h y 48 h, sí se observaron diferencias significativas entre el control de 24 h y los grupos control sin H₂O₂, 2,5 y 5 µM a las 48 h de tratamiento. El tratamiento de 50 µM demostró una pérdida de viabilidad de alrededor del 100% a las 24 y 48 h (p=0,0001). En base a estos

resultados, se resolvió exponer las células a concentraciones de peróxido <50 μM durante 24 h en DMEM con SBF 10% (Figura 3 B).

En relación con la determinación de las concentraciones subletales de H_2O_2 , se observó que 1, 2,5, 5 y 10 μM , presentaban viabilidad similar al control, mientras que esta disminuía significativamente en el grupo de 50 μM ($p=0,0001$) Figura 3 C).

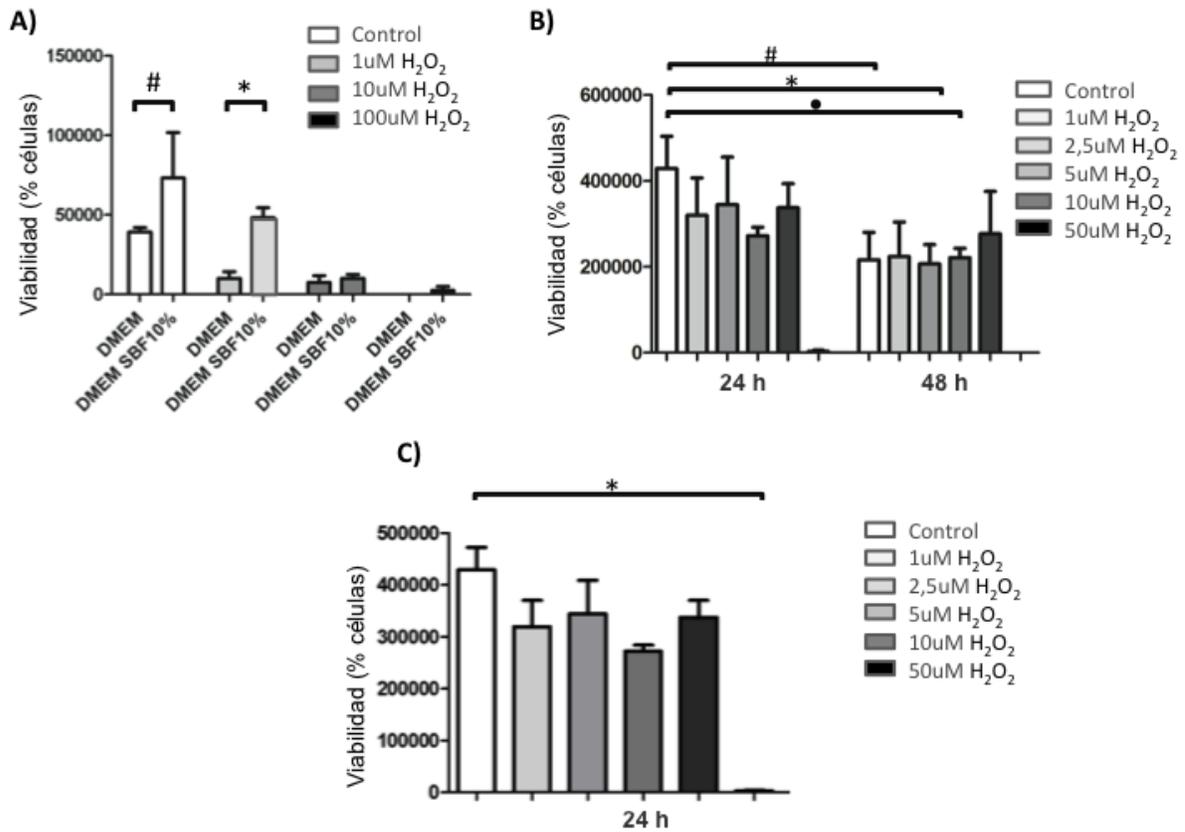


Figura 3. Efecto del H₂O₂ en la viabilidad de FLP. A) Viabilidad según presencia de SBF 10%. #p=0,0536; *p=0,0005. B) Viabilidad según tiempo de exposición a H₂O₂. (p=0,0000) #p=0,039; *p=0,025; •p=0,048. C) Viabilidad según concentración de exposición a H₂O₂. (p=0,0000) *p=0,0001. Barras expresan promedio ± DS.

Finalmente, se realizó una curva de viabilidad y análisis morfológico con concentraciones de H_2O_2 entre 2,5 y 10 μM por 24 h en DMEM con SBF 10% (Figura 4). No se observaron diferencias en la viabilidad celular ($p > 0,05$) ni en la morfología celular (Figuras 4 y 5, respectivamente), y por tanto, estas condiciones de exposición a peróxido se definieron como subletales para los experimentos subsiguientes.

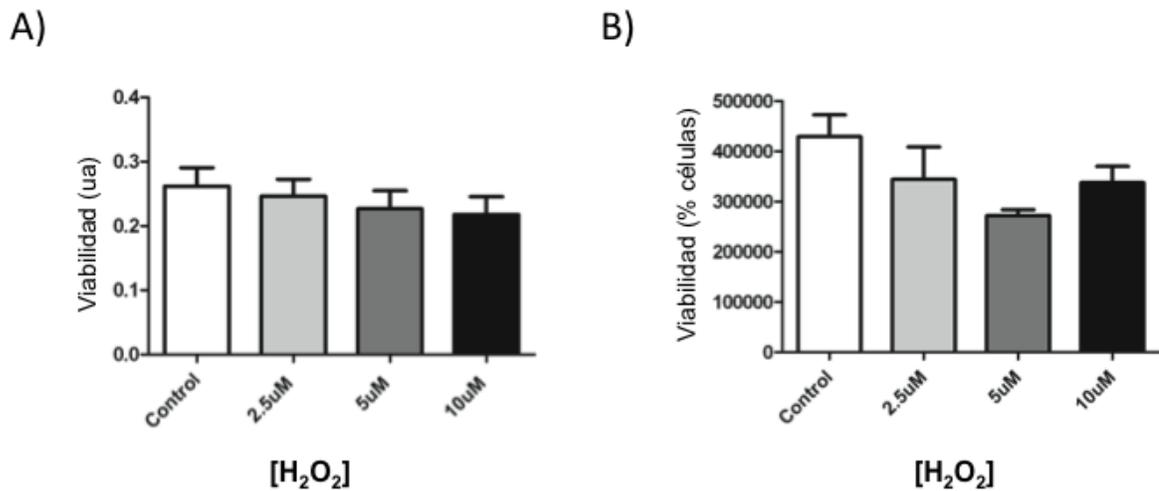


Figura 4. Efecto del H_2O_2 en la viabilidad de FLP. A) Exclusión de azul de tripán B) Ensayo MTS. $p > 0,05$. Datos expresados como promedio \pm DS.

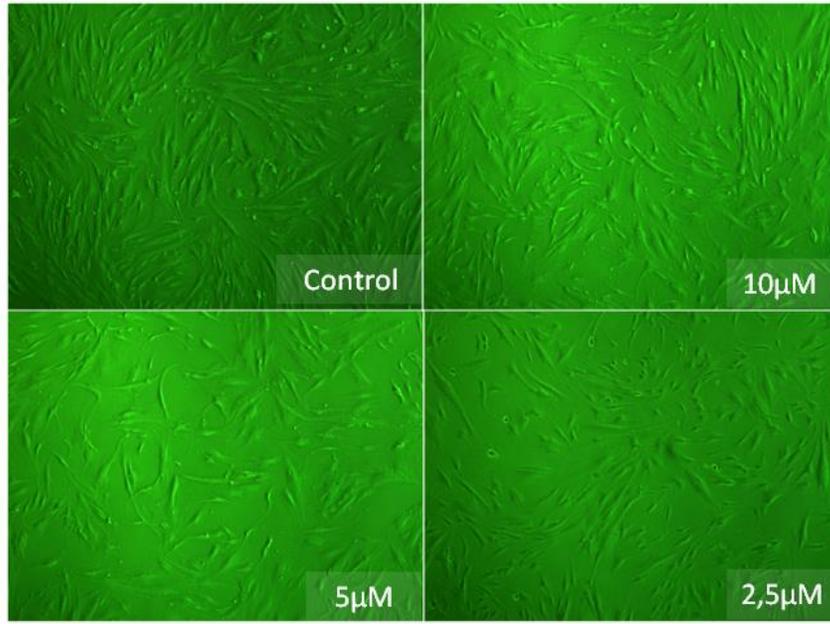


Figura 5. Efecto del H₂O₂ en la morfología de FLP.

3. Efecto del H_2O_2 sobre la activación de $NF\kappa B$

Se observó la distribución celular de $NF\kappa B$ inducida por H_2O_2 en FLP mediante análisis de la translocación nuclear de la subunidad p65. En el grupo control sin adición de H_2O_2 , p65 se inmunolocalizó mayoritariamente en el citoplasma (Figura 6 a). La adición de H_2O_2 en concentración de 2,5 μM indujo la movilización parcial de la subunidad p65 al núcleo (Figura 6 b), mientras que al adicionar 5 μM de H_2O_2 , este se observó casi exclusivamente en el núcleo (Figura 6 c), en forma similar a LPS 2 ng/ml (control positivo; Figura 6 d). Por el contrario, H_2O_2 10 μM resultó en una inhibición de la translocación nuclear de p65, con una notoria acumulación perinuclear (Figura 6 e). Tanto la adición de 5 μM H_2O_2 en conjunto con la enzima catalasa (Figura 6 f), como H_2O_2 más el péptido inhibidor de $NF\kappa B$, SN50 (Figura 6 g) demostraron una inhibición en la translocación de p65 al núcleo. De la misma forma, la adición de LPS y SN50 (Figura 6 h) inhibieron la translocación de p65 al núcleo.

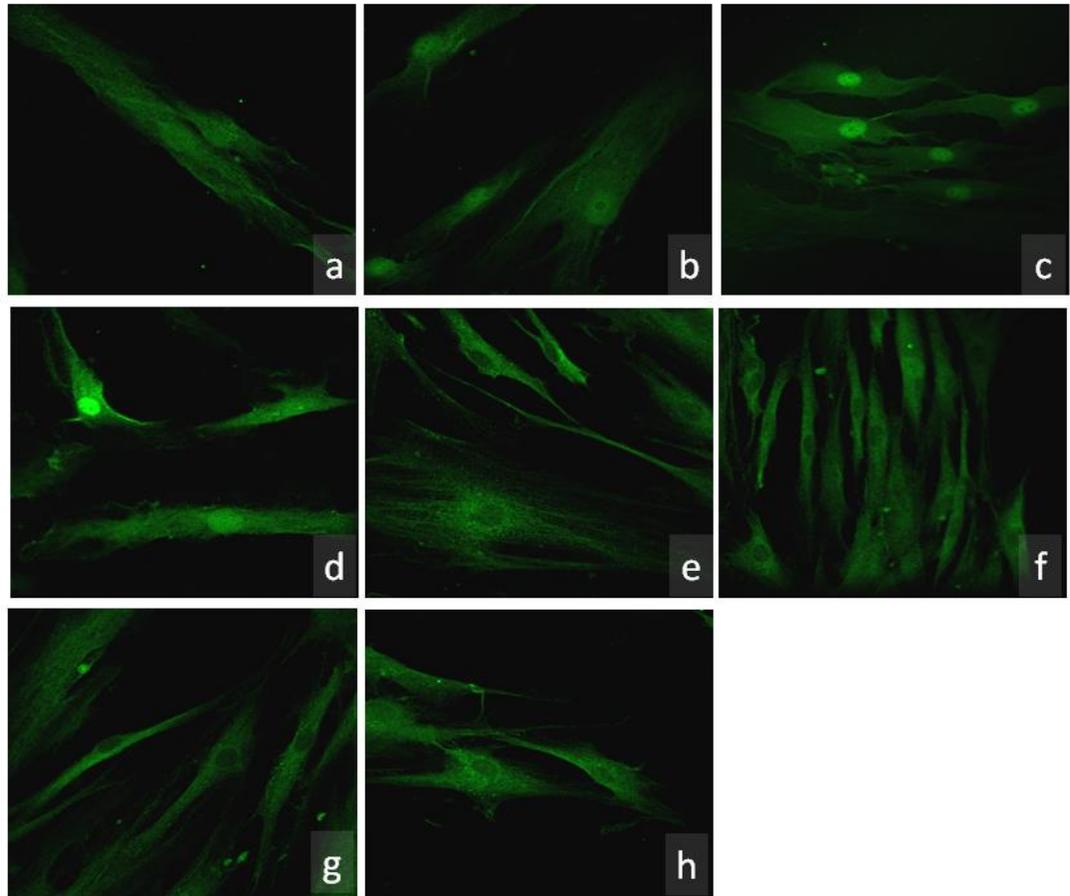


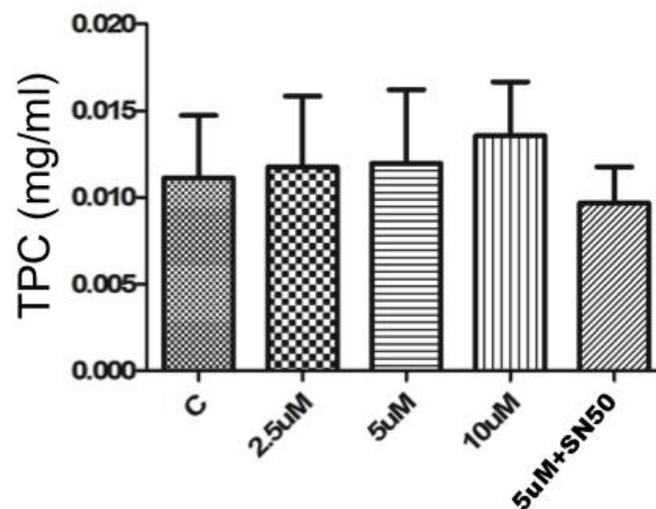
Figura 6. Efecto del H_2O_2 sobre la inmunolocalización de la subunidad p65 de $NF\kappa B$ en FLP: a) Control sin H_2O_2 , b) $2,5 \mu M H_2O_2$, c) $5 \mu M H_2O_2$, d) control positivo de LPS, e) $10 \mu M H_2O_2$, f) control $5 \mu M H_2O_2$ y catalasa, g) control $5 \mu M H_2O_2$ y SN50 y h) control LPS y SN50.

4. Niveles y actividad de MMPs -2 y -9 en cultivos primarios de FLP, tratados o no con H₂O₂ y asociación con vía NFκB.

4.1 Determinación de la concentración de proteínas totales.

Se determinó la concentración de proteínas totales (CPT) en sobrenadantes de FLP sin tratamiento con peróxido (C), H₂O₂ 2,5, 5; 10 μm y 5 μm H₂O₂ más SN50 por 24 h. No se observaron variaciones significativas en la CPT entre los grupos de estudio (experimentales y controles) (Figura 7).

Figura 7. Concentración de proteínas totales en sobrenadante de FLP



expuestos a H₂O₂. C: Control sin H₂O₂; 2,5, 5 y 10 μM de H₂O₂; 5μM+PI: 5 μM H₂O₂ + SN50 por 24 h. p>0,05.

4.2 Niveles y actividad de MMPs -2 y -9 y su asociación con la vía *NFκB*

Se identificaron bandas gelatinolíticas correspondientes a la proforma de MMP-9 (~92 kDa), la forma activa de MMP-9 (~85kDa), la proforma de MMP-2 (~72 kDa) y su respectiva forma activa (~64 kDa) tanto en los grupos expuestos a H₂O₂ como controles. La banda más prominente en todos los casos correspondió a proMMP-2 (Figura 8).

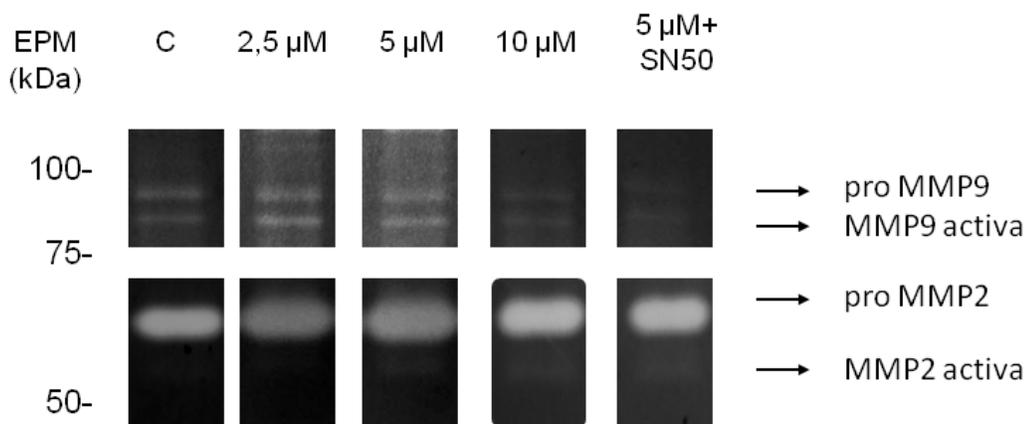


Figura 8. Actividad gelatinolítica de MMP -2 y -9 en sobrenadante de FLP expuestos a H₂O₂. EPM: Estándar de peso molecular; C: Control sin H₂O₂; 2,5, 5 y 10 μM de H₂O₂; 5μM+PI: 5 μM H₂O₂ + SN50 por 24 h.

La actividad gelatinolítica de pro MMP-9 no tuvo variaciones significativas en los grupos experimentales (Figura 9 A), mientras que la MMP-9 activa fue significativamente mayor en el grupo expuesto a 2,5 μM de H_2O_2 en comparación con los grupos expuestos a concentraciones de 10 μM y 5 μM /SN50 (Figura 9 B). El porcentaje de activación observado para MMP-9 fue significativamente mayor en el grupo de 5 μM en comparación con 5 μM con SN50 (Figura 9 C).

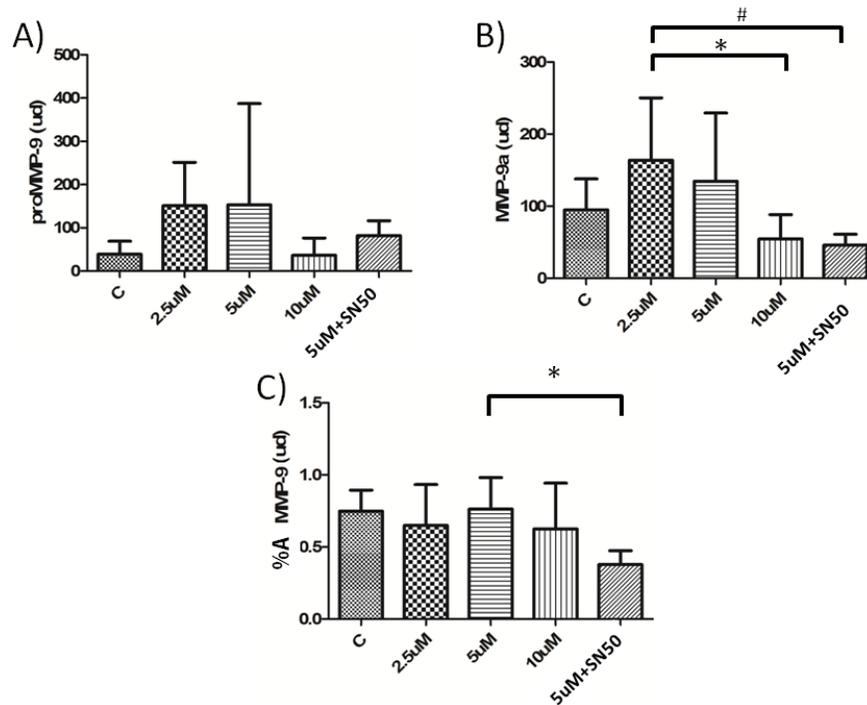


Figura 9. Efecto del H₂O₂ sobre la actividad de MMP-9 en sobrenadante de FLP. A) Pro MMP-9 B) MMP-9 activa. (p=0,002) #p=0,01; *p=0,015. C) Porcentaje de activación MMP-9, (p=0,050) *p=0,049; ud: unidades densitométricas; C: Control sin H₂O₂; 2,5, 5 y 10 μM de H₂O₂; 5μM+PI: 5 μM H₂O₂ + SN50 por 24 h.

La actividad gelatinolítica de pro MMP-2 no tuvo variaciones significativas entre los grupos analizados (Figura 10 A); mientras que se observó un aumento significativo de MMP-2 activa en el grupo expuesto a H₂O₂ 5 μM respecto del control. Por otro lado, se observaron reducciones significativas en la actividad de los grupos expuestos a 10 μM y 5 μM/SN50 con respecto a 5 μM (Figura 10 B). En el caso del porcentaje de activación de MMP-2 se observó un aumento significativo en el grupo expuesto a 5 μM en relación con el control no expuesto (Figura 10 C).

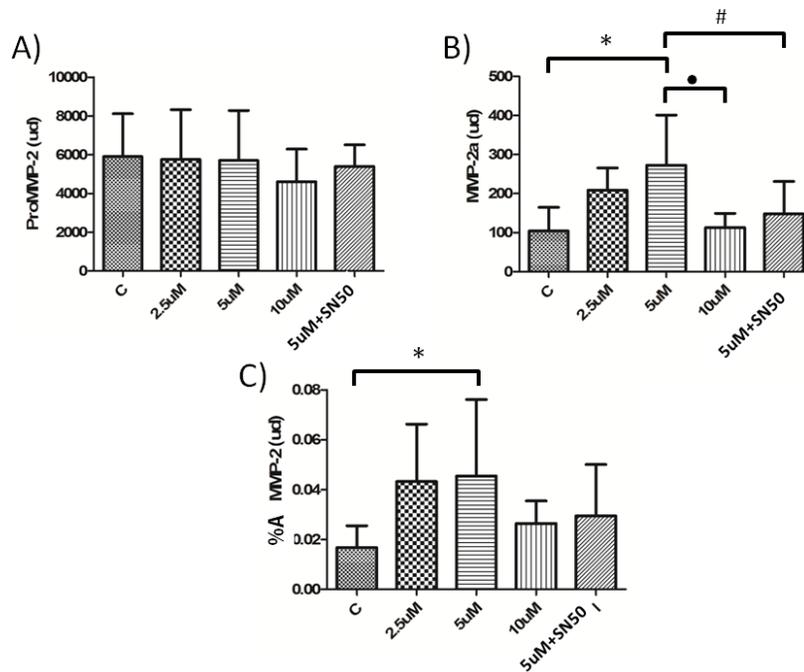


Figura 10. Efecto del H₂O₂ sobre la actividad de MMP-2 en sobrenadante de FLP. A) Pro MMP-2 B) MMP-2 activa. (p=0,0002) #p=0,001; *p=0,001; *p=0,050. C) PA MMP-2 (p=0,037) *p=0,038. ud= unidades densitométricas. C: Control sin H₂O₂; 2,5, 5 y 10 μM de H₂O₂; 5μM+PI: 5 μM H₂O₂ + SN50 por 24 h.

Discusión

En las patologías periodontales inflamatorias, las ERO generadas por fagocitos, como monocitos y PMN, se acumulan en los sitios de infección causando la destrucción tisular. Es así como diversos estudios han reportado que estos agentes, en particular, H_2O_2 , puede inducir la expresión y activación de las metaloproteasas osteolíticas como las MMPs-13, -2 y -9 en líneas celulares epiteliales, fibroblásticas y osteoblásticas. Este mecanismo se basa en la capacidad del agente oxidante de actuar como segundo mensajero por la vía NF κ B, gatillando la unión de este factor de transcripción a los promotores de genes de citoquinas pro-inflamatorias (11, 18, 19, 23). Sin embargo, dado que se desconoce el efecto del H_2O_2 u otro compuesto oxidante sobre la actividad de las metaloproteasas osteolíticas y las vías de señalización involucradas en los tejidos periodontales, esta investigación se centró en la actividad de las MMPs -2, -9 y la mediación de NF κ B en cultivos primarios de FLP humanos sometidos a estímulo oxidante de H_2O_2 .

Los resultados obtenidos demostraron que las células aisladas de los cultivos primarios de ligamento periodontal humano presentaron morfología tipo fibroblasto y la ausencia de inhibición del crecimiento por contacto, coincidiendo

con lo descrito por estudios previos (73). No obstante esto, la tarea de caracterización molecular de los FLP, presentó una mayor complejidad debido a que se han postulado muchos marcadores fenotípicos para este tipo celular. Esto se basa en la heterogeneidad de los FLP que comparten características tanto fibroblásticas como osteoblásticas (24, 26). Es así como el fenotipo osteoblástico de los FLP se sustenta en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, sensibilidad a la hormona paratiroidea, producción de osteocalcina y formación de nódulos de fosfato de calcio (14). De acuerdo a esto, el potencial de diferenciación de los FLP hacia un linaje osteoblástico o cementoblástico los sitúa como células esenciales en la mantención de la integridad y recambio de los tejidos periodontales (15).

Por lo anterior, ante la ausencia de un marcador específico para FLP, a la fecha existe un consenso general entre los distintos estudios que recomiendan utilizar varios marcadores celulares para verificar el linaje de las células aisladas (14, 74). Así, para esta investigación se seleccionaron marcadores tales como periostina y fosfatasa alcalina, que caracterizan la dualidad fenotípica de este tipo celular y que han sido analizados en forma recurrente en diversos estudios basados en cultivos primarios de FLP (15, 33, 70, 74).

En relación con los marcadores moleculares analizados en este estudio, las células obtenidas fueron inmunonegativas para pancitoqueratina, descartando de esta manera la contaminación epitelial. A su vez, los cultivos demostraron inmunopositividad para marcadores mesenquimales como vimentina, α -actina y periostina. Esta última, corresponde a una proteína producida por las células presentes en tejidos fibrosos ricos en colágeno que están sujetos a estrés mecánico, tales como las fuerzas masticatorias (75). De esta forma, se ha propuesto a la periostina como un marcador diferenciador entre FLP y fibroblastos gingivales (14).

Por otro lado, al analizar la actividad de fosfatasa alcalina en FLP, ésta se detectó en las células que fueron sometidas a los estímulos de ácido ascórbico y dexametasona, reconocidos inductores osteoblásticos. Además, se identificó en FLP, así como en fibroblastos gingivales, estableciéndose una tendencia a una mayor actividad en el grupo estimulado con medio osteogénico y el grupo de FLP sin inducción. Sin embargo, la falta de diferencias significativas en la actividad de la fosfatasa alcalina en estos grupos celulares puede deberse a que la producción de fosfatasa alcalina, puede presentar variabilidad experimental entre individuos y número de pasajes (14). Además, a

pesar de ser considerada como un marcador de linaje óseo, esta se expresa en una fase temprana del proceso, compartiendo, por lo mismo, niveles muy cercanos a los exhibidos basalmente por los FLP. Probablemente, la realización de un ensayo inductor de diferenciación osteogénica que contemple mayor tiempo de exposición al estímulo diferenciador permitiría establecer diferencias fenotípicas con mayor sensibilidad entre los grupos celulares. A pesar de esto, el conjunto de todos los aspectos evaluados permitió establecer la presencia de características tipo osteoblasto en las células aisladas. Sumado a lo anterior se debe considerar la zona de origen de extracción del tejido usado para catalogar a las células obtenidas como FLP. En base a todos estos antecedentes, los cultivos primarios obtenidos se caracterizaron como FLP.

Las ERO son de interés en este estudio debido a que se han asociado con la destrucción de tejidos de soporte dentario en las enfermedades periodontales durante los últimos años (22). No obstante, el mecanismo de acción se conoce en forma parcial (22). Los fagocitos activados, tales como los PMN y macrófagos, han sido identificados como los principales productores de ERO en la periodontitis, a través de la NADPH oxidasa (62). Se ha reportado que cuando la generación de ERO excede la capacidad de los sistemas antioxidantes se produce daño masivo a los constituyentes celulares (61, 62).

Además, según la dosis empleada, el tratamiento con H_2O_2 produce una detención del crecimiento celular. Al respecto, se ha relacionado el daño oxidativo con un estado de senescencia en los fibroblastos humanos (76). Entre todos los agentes oxidantes, el más estudiado ha sido el H_2O_2 , puesto que, como ventaja experimental, a bajas dosis tiene la capacidad de difundir libremente por la membrana celular induciendo la señalización celular (77).

Se ha demostrado que bajo condiciones de privación de suero algunos tipos celulares similares a los FLP, tales como los fibroblastos gingivales producen ERO en forma espontánea (72). Se ha reportado que el incremento de ERO gatillado por la privación sérica induce la muerte celular por apoptosis, pero a la vez se ignora el mecanismo mediante el cual sucede. Dado que las mitocondrias representan la principal fuente de ERO endógena, se ha atribuido al modulador mitocondrial 1 (Romo-1) un papel central en la inducción de apoptosis de células privadas de factores de crecimiento. Así, se ha sugerido que si Romo-1 se ubica en la membrana mitocondrial; este puede jugar un rol importante en la liberación de las ERO hacia el citosol (78). Por otro lado, se debe considerar a la autofagia como una vía degradativa lisosomal que provee la energía necesaria a través de la autodigestión bajo condición de privación. Durante el estrés oxidativo, la autofagia sirve como mecanismo de

defensa para eliminar las proteínas y organelos dañados. Es así, como se ha descrito que en una línea celular murina de células beta del páncreas, el cultivo con bajo aporte de suero incrementó los niveles de varias proteínas de la vía autofágica, incluyendo a la proteína relacionada con la autofagia 4 (ATG4), Beclina 1, proteína de membrana asociada al lisosoma 2 (LAMP-2), y la proteína asociada al gen de la resistencia a los rayos ultravioletas (UVRAG) (79). Coincidiendo con lo expuesto, nuestros resultados muestran que la exposición a H₂O₂ a partir de una concentración de 1 μM en cultivos carentes de SBF se asocia con una disminución significativa de la viabilidad celular.

En este estudio se demostró que la exposición de los FLP a H₂O₂ por 24 h en concentraciones menores o iguales a 10 μM en presencia de SBF 10% no alteraba la viabilidad ni morfología celular; y por tanto estas condiciones se definieron como las condiciones experimentales de exposición subletal. De esta manera, se pudo evaluar el efecto del H₂O₂ sobre la señalización celular, evitando un nivel de estrés oxidativo mayor que pudiera causar lesión y muerte celular.

Se ha asociado comúnmente a las ERO con la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFκB considerados por esto sensibles al estado

oxidativo. El rol del H_2O_2 como segundo mensajero ha sido abordado en estudios previos que describen que el H_2O_2 estimula la fosforilación del complejo $NF\kappa B / I\kappa B$, activando de esta manera a $NF\kappa B$. Esto, a su vez, permite su translocación nuclear y facilita la unión de este factor de transcripción a los promotores de genes como citoquinas proinflamatorias y/o osteolíticas; como es el caso de IL-2, -6, -8, IFN- β y TNF- α (22). También se ha observado que las ERO pueden aumentar la expresión y actividad de MMPs osteolíticas como las MMPs-13, -2 y -9 (11, 18, 19, 23).

No obstante lo anterior, las diferencias inherentes a los tipos celulares empleados, así como las condiciones experimentales heterogéneas entre los distintos estudios determinan una variabilidad en la importancia relativa de las ERO en la activación de MAPK y $NF\kappa B$, así como los roles mediadores de estas moléculas en la generación de citoquinas pro-inflamatorias y MMPs. (11, 18, 19, 23, 68, 70, 71, 77).

En el presente estudio se observó que la exposición de FLP al H_2O_2 resultó en la activación de la vía $NF\kappa B$ evidenciada por la translocación nuclear de la subunidad p65, con comportamiento bimodal dependiendo de la concentración de peróxido utilizada. Es así como, en concentraciones entre 2,5

y 5 μM se indujo la movilización de la subunidad p65 al núcleo. Por el contrario, dosis de 10 μM resultaron en una inhibición de la translocación nuclear de la sub unidad p65, con una notoria acumulación perinuclear. La acumulación perinuclear del complejo puede ser explicada por el posible efecto citotóxico y activación subsecuente de las vías autofágicas previamente descritas.

En cuanto a la determinación del efecto del H_2O_2 sobre la actividad MMP y la mediación de este efecto vía $\text{NF}\kappa\text{B}$, en este estudio se observó que la exposición de FLP a dosis subletales de H_2O_2 no modificó los niveles de proteínas totales, ni específicamente de proMMP-2; en cambio, indujo aumentos significativos sobre la actividad gelatinolítica de la forma activa de MMP-2 en una concentración de 5 μM , en relación con los controles no expuestos a H_2O_2 . De modo similar, el porcentaje de activación para MMP-2 en el grupo de FLP expuesto a H_2O_2 5 μM fue significativamente mayor que en el grupo control. Por el contrario, la actividad MMP-2 disminuyó significativamente al elevar la concentración de H_2O_2 a 10 μM , alcanzando niveles similares a los controles no expuestos. Estos resultados sugieren que dosis subletales de peróxido no modifican los niveles de MMP-2, sino que son capaces de inducir un aumento en su actividad gelatinolítica en concentraciones bajas de H_2O_2 ; mientras que este efecto inductor se pierde en concentraciones subletales más

elevadas de H₂O₂. Finalmente, la inhibición de la vía de señalización de NFκB con el inhibidor SN50 redujo la actividad MMP-2 en FLP expuestos a H₂O₂ 5 μM. Estos resultados sugieren que el aumento de actividad MMP-2 inducido por H₂O₂ estaría mediado al menos en parte por la activación de la vía NFκB.

El análisis de MMP-9 en FLP tratados con H₂O₂ demostró que la actividad gelatinolítica de pro MMP-9 no presentó variaciones significativas. En cambio, MMP-9 activa fue significativamente mayor en el grupo de exposición a peróxido 2,5 μM en comparación con el grupo expuesto a peróxido 5 μM/ SN50. A su vez, el porcentaje de activación para MMP-9 fue significativamente mayor en el grupo de FLP tratado con 5 μM de H₂O₂ que en el grupo el grupo expuesto a peróxido 5 μM/ SN50. Según esto, tanto la actividad de MMP-9, como su porcentaje de activación, indican que la actividad gelatinolítica de MMP-9 estaría influenciada por la activación de la vía de señalización NFκB. Por el contrario, la exposición de FLP a concentraciones de H₂O₂ 10 μM resultaron en una reducción significativa de la actividad MMP-9 en comparación con una concentración de 2,5 μM. Estos resultados sugieren que el efecto del H₂O₂ en concentraciones subletales es dosis-dependiente. En nuestro modelo experimental, concentraciones entre 2,5-5 μM indujeron un aumento de la actividad gelatinolítica, efecto que se pierde al elevar la concentración de H₂O₂

a 10 μ M. La falta de inducción de actividad MMP -2 y MMP-9 podría asociarse con la pérdida de la translocación nuclear de NF κ B frente a H₂O₂ en concentraciones de 10 μ M.

Existe un conocimiento parcial de las vías de señalización asociadas a ERO y las moléculas efectoras finales que participan en los procesos inflamatorios relacionados a las enfermedades periodontales. Por otro lado, la pleiotropía de muchos agentes oxidantes ha complejizado la dilucidación de los mecanismos moleculares exactos que puedan explicar la asociación entre las ERO y la destrucción tisular observada en patologías tan prevalentes como las periodontitis. Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran en línea con otros estudios donde el estímulo de ERO se relaciona con la expresión de mediadores inflamatorios en otros tipos celulares. Más aún, la información generada hasta la fecha sugiere que el estrés oxidativo es en parte responsable de la modificación de la calidad y cantidad de matriz extracelular mediada por el aumento de MMP-2, -9 Y -13 en fibroblastos diploides (11), fibroblastos cardíacos (80) y células tumorales (11, 23, 80).

Las ERO pueden actuar a nivel pre y post transcripcional. Se ha descrito que el estímulo oxidativo del H₂O₂ en concentraciones subletales aumenta la

actividad de MMP-2 y -9, sin aumentar la producción de estas MMPs en fibroblastos diploides normales (TIG-7), indicando la posibilidad de regulación a nivel post transcripcional (11).

Por otro lado se ha descrito que las ERO están relacionadas con el aumento de invasividad en las células epiteliales tumorales en respuesta a la estimulación con dosis subletales de H₂O₂, la que estaría mediada por la sobreexpresión de MMP-13 y en menor proporción de MMP-2 y -9. La variación en la expresión y los niveles de estas MMPs bajo estímulo oxidativo, fue acompañada por un cambio fenotípico de las células epiteliales que adquirieron características tipo fibroblasto. A su vez, al examinar los niveles de MMP-2, -9 y -13 en el sobrenadante de las células epiteliales, se observó un aumento en la actividad de proMMP-9, MMP-9 activa y proMMP-2, evidenciando un efecto tanto a nivel pre como post transcripcional (11).

Estudios previos han demostrado una producción basal tanto de MMP-2 como de MMP-9 en FLP, mientras que el estímulo con sobrenadantes de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* indujo un aumento en los niveles de MMP-2, no así en MMP-9; efecto que fue completamente inhibido con fármacos que inhiben la síntesis de proteínas a distintos niveles post traduccionales (60).

Nuestros resultados indican que el efecto del peróxido modifica fundamentalmente la actividad de MMP-2 y -9 en FLP. Esta variación pudo ser causada por una activación directa de las proformas por H_2O_2 , y/o por la estimulación en las vías inflamatorias que inducen la producción de modificadores bioactivos de las MMPs (9, 10). Es importante destacar que el aumento en la actividad de las MMPs disminuyó producto de la adición de SN50, indicando una participación de la vía $NF\kappa B$ (23). A pesar de que esta vía normalmente modifica la traducción proteica, en este caso, el efecto sobre la actividad MMP podría ser indirecto, a través de la sobreexpresión de activadores de MMPs o bien de una disminución de sus inhibidores (17). Al respecto, existen reportes previos sostienen que la vía $NF\kappa B/I\kappa B$ puede regular la expresión y actividad de MMP-2, tanto en cultivos celulares de fibroblastos dérmicos (81), como en células de músculo liso (82).

Sobre la base de los antecedentes expuestos, el presente trabajo contribuye a comprender los mecanismos de acción de las ERO sobre la homeostasis periodontal y los posibles mecanismos de destrucción involucrados, demostrando por primera vez que el H_2O_2 en concentraciones reducidas aumenta la actividad gelatinolítica de MMP-2, al menos en parte por

activación de la vía NF κ B en cultivos primario de FLP humanos (Figura 11). Los resultados indican que las ERO podrían tener un efecto directo sobre la activación de las MMPs estudiadas, como también indirecto, mediado por NF κ B. Los resultados de este estudio podrían complementarse a futuro evaluando el efecto del H₂O₂ sobre la regulación transcripcional de estas MMPs en FLP.

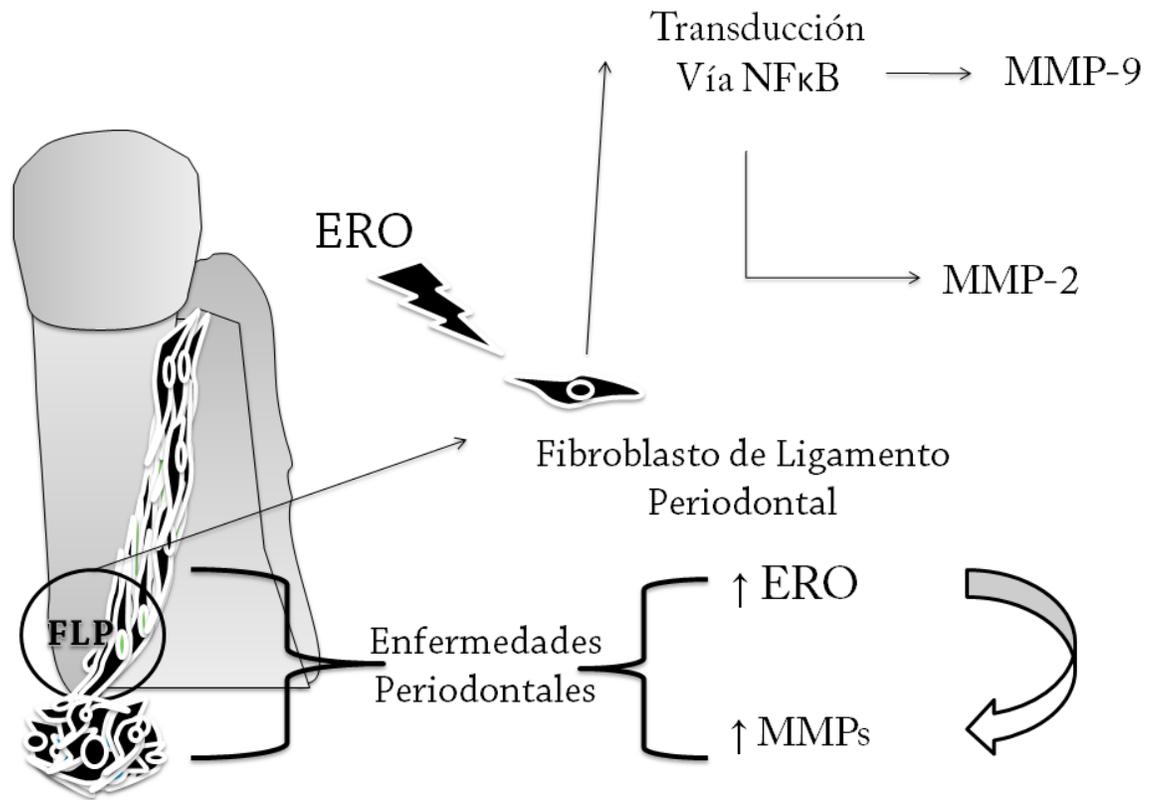


Figura 11. Modelo propuesto: Las ERO generadas en las enfermedades periodontales aumentan la actividad de MMPs -2 en FLP humanos. Este efecto es mediado, al menos en parte, vía NFκB.

Conclusiones

En este estudio comprobamos parcialmente la hipótesis, “El H_2O_2 aumenta la actividad de las MMPs -2 y -9 en FLP humanos, efecto mediado al menos en parte, vía $NF\kappa B$ ”, puesto que:

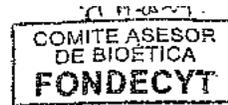
1. El H_2O_2 en concentraciones menores a $10\ \mu M$ induce la activación de $NF\kappa B$ en FLP humanos.
2. H_2O_2 en concentraciones subletales de $5\ \mu M$ aumenta la actividad de MMP-2 en FLP humanos.
3. La actividad de MMP-2 inducida por concentraciones subletales de H_2O_2 , estaría influenciada por la activación de $NF\kappa B$.
4. La actividad de MMP-9 se encuentra regulada, al menos parcialmente, por la vía de señalización $NF\kappa B$.
5. La actividad de MMP-2 y -9 en concentraciones de H_2O_2 sobre los $10\ \mu M$ disminuye significativamente con respecto a $2,5$ y $5\ \mu M$.

Anexos

Anexo 1: Ficha clínica

NOMBRE:			FECHA		
SEXO:	F	M	EDAD:		
TELÉFONO:					
ANAMNESIS:					
TABAQUISMO	NO	SI	Nº		
ENFERMEDADES GENERALES	NO	SI	CIGARRILLOS/DÍA		
TRATAMIENTOS MÉDICOS			CUÁL		
ACTUALES	NO	SI			
O ÚLTIMOS 6 MESES			CUÁL		
EXAMEN CLÍNICO:				SI	NO
DIENTE A TRATAR:	+	-	DOLOR		
PERCUSIÓN	NO	SI	ESPONTÁNEO		
MOVILIDAD	SI	NO			
TRAUMA OCLUSAL			GRADO:		
VESTÍBULO:	FÍSTULA		AUMENTO DE VOLUMEN		
ENROJECIMIENTO					
GINGIVITIS O PERIODONTITIS:	SI	NO			
CARIES O RESTO RADICULAR	SI	NO	VITALOMETRÍA	+	-
RADIOGRAFÍA:					
TAMAÑO DE LA LESIÓN (MM)	VERTIC		HORIZONTAL		
AL					
DIAGNÓSTICO:					
PRIMER CONTROL (POST-OBTURACIÓN)					
FECHA					
RADIOGRAFÍA:					
TAMAÑO DE LA LESIÓN (MM)					
SIGNOS O SÍNTOMAS	SI	NO	PERCUSIÓN	+	-
SEGUNDO CONTROL (3 MESES POST- OBTURACIÓN)					
FECHA					
RADIOGRAFÍA:					
TAMAÑO DE LA LESIÓN (MM)	VERTIC		HORIZONTAL		
SIGNOS O SÍNTOMAS:	AL		PERCUSIÓN	+	-
TERCER CONTROL (4 MESES POST- OBTURACIÓN)					

Anexo 2: Formulario de Consentimiento Informado



Formulario de Consentimiento Informado

Fecha Edición: 04.05.09

Trabajo de Investigación: Caracterización del estado oxidativo y proteólisis apical crónica en el fluido gingival crevicular: ¿una nueva herramienta en la búsqueda de marcadores precoces de pronóstico?

Investigador Responsable: Marcela Hernández Ríos, Dpto. Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Fono 9781808, email: hernandezrios@gmail.com

Presidente del Comité Científico: Dr. Francisco Campos, Fono: 9781701

Antecedentes Generales

Las lesiones periapicales (Periodontitis apical crónica) se producen generalmente como consecuencia de caries dentales. El tratamiento indicado para estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones de esta patología. El propósito del presente estudio es caracterizar posibles mediadores de destrucción tisular asociados a estas lesiones, en estados de enfermedad, reparación y salud. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura.

Procedimiento

Se incluirán sujetos mayores de 18 años, que en el examen clínico y radiográfico presenten diagnóstico de Periodontitis Apical Crónica. Cuando esté indicado, serán sometidos a diagnóstico, durante el cual se les tomará una muestra de fluido del surco dentario mediante tiras de papel absorbente, antes, una semana después del tratamiento, después de 3 y 6 meses posttratamiento y de un diente control. El financiamiento del tratamiento endodóntico será responsabilidad del paciente.

En los pacientes que presenten indicación de extracción dentaria, a las lesiones asociadas se les tomará una biopsia y/o se extirpará el tejido a partir del diente extraído. Tanto la biopsia como la extracción se realizarán en forma gratuita para el paciente. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos ni costos adicionales para el paciente y una vez analizadas serán descartadas. Lo anterior significa que no se harán exámenes genéticos en las muestras.

El total de muestras y datos obtenidos serán almacenadas por el investigador responsable para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio, y no usarán para ningún trabajo futuro. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, solo se estadizarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

Beneficio

Como beneficio de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les obsequiarán elementos de higiene dental. Además, el diagnóstico de biopsias y radiografías con fines de este estudio no tendrán costo económico.

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de investigación.

Identificación Paciente:

Nombre
RUT
Teléfono
Firma

Identificación Dentista

Nombre
RUT
Teléfono
Firma

Identificación Jefe de Clínica

Nombre
RUT
Teléfono
Firma

Bibliografía

1. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28.
2. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res*. 1997 Jan;32(1 Pt 2):159-65.
3. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNFalpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2002 Jun;37(3):167-76.
4. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004 Nov;10(6):311-8.
5. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):306-19.
6. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis*. 2006 May;12(3):283-9.
7. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):391-401.
8. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis*. 2000 May;6(3):138-51.
9. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*. 1997 Feb;11(2):118-24.
10. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):247-54.
11. Mori K, Shibamura M, Nose K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2004 Oct 15;64(20):7464-72.
12. Wei PF, Ho KY, Ho YP, Wu YM, Yang YH, Tsai CC. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 2004 Oct;39(5):287-93.
13. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, et al. Pro-oxidant Status and Matrix Metalloproteinases in Apical Lesions and Gingival Crevicular Fluid as Potential Biomarkers for Asymptomatic Apical Periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm (Lond)*. 2012 Mar 21;9(1):8.
14. Pi SH, Lee SK, Hwang YS, Choi MG, Kim EC. Differential expression of periodontal ligament-specific markers and osteogenic differentiation in human

papilloma virus 16-immortalized human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2007 Apr;42(2):104-13.

15. Quintero JC, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Agarwal S. LPS responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Dent Res.* 1995 Nov;74(11):1802-11.

16. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001 Aug 15;31(4):509-19.

17. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2007 Sep 14;282(37):27298-305.

18. Ramamurthy NS, Vernillo AT, Greenwald RA, Lee HM, Sorsa T, Golub LM, et al. Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *J Bone Miner Res.* 1993 Oct;8(10):1247-53.

19. Zaragoza C, Lopez-Rivera E, Garcia-Rama C, Saura M, Martinez-Ruiz A, Lizarbe TR, et al. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts. *J Cell Sci.* 2006 May 1;119(Pt 9):1896-902.

20. Wu YM, Richards DW, Rowe DJ. Production of matrix-degrading enzymes and inhibition of osteoclast-like cell differentiation by fibroblast-like cells from the periodontal ligament of human primary teeth. *J Dent Res.* 1999 Feb;78(2):681-9.

21. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1995 Sep;63(9):3576-81.

22. Borges I, Jr., Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Frode TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:45794.

23. Yoon SO, Park SJ, Yoon SY, Yun CH, Chung AS. Sustained production of H₂O₂ activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):30271-82.

24. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 1):144-54.

25. Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2010 Apr;45(2):262-70.

26. Saito S, Ngan P, Saito M, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interactive effects between cytokines on PGE production by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1990 Aug;69(8):1456-62.

27. Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegame M, Ishibashi O, Okuda K, et al. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Sci.* 2002 Nov 1;115(Pt 21):4191-200.
28. Bar-Kana I, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium. *European journal of oral sciences.* 1998 Jan;106 Suppl 1:357-64.
29. Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, et al. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol.* 2010 Dec;37(12):1088-99.
30. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone.* 2006 Mar;38(3):409-19.
31. Jager A, Gotz W, Lossdorfer S, Rath-Deschner B. Localization of SOST/sclerostin in cementocytes in vivo and in mineralizing periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Res.* 2010 Apr;45(2):246-54.
32. Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, et al. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene.* 2001 Sep 19;275(2):279-86.
33. Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2011 Aug;46(4):407-16.
34. Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biol.* 2008 Oct;27(8):682-92.
35. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. *J Periodontal Res.* 1995 Nov;30(6):382-9.
36. Ortega A, Farina V, Gallardo A, Espinoza I, Acosta S. Nonendodontic periapical lesions: a retrospective study in Chile. *Int Endod J.* 2007 May;40(5):386-90.
37. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348-81.
38. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000 Jun;15(3):139-50.
39. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000 Feb;16(1):1-8.
40. Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol.* 1997 Mar;2(1):3-10.

41. Gamonal JA, Lopez NJ, Aranda W. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int Dent J*. 1998 Apr;48(2):96-103.
42. Page RC, Schroeder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol*. 1981 Sep;52(9):477-91.
43. Apajalahti S, Sorsa T, Ingman T. Matrix metalloproteinase -2, -8, -9, and -13 in gingival crevicular fluid of short root anomaly patients. *Eur J Orthod*. 2003 Aug;25(4):365-9.
44. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2003 May 2;92(8):827-39.
45. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):411-24.
46. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*. 1998 Mar;139(3):1338-45.
47. Choi BK, Jung JH, Suh HY, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 by a novel oral spirochetal species *Treponema lecithinolyticum*. *J Periodontol*. 2001 Nov;72(11):1594-600.
48. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol*. 2003 Feb;74(2):188-95.
49. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res*. 1997 Aug;46(8):310-9.
50. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:226-38.
51. Ilgenli T, Vardar-Sengul S, Gurkan A, Sorsa T, Stackelberg S, Kose T, et al. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-13 levels and molecular forms in various types of periodontal diseases. *Oral Dis*. 2006 Nov;12(6):573-9.
52. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*. 1995 Jul 1;309 (Pt 1):299-306.

53. Ohshiba T, Miyaura C, Inada M, Ito A. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis. *Br J Cancer*. 2003 Apr 22;88(8):1318-26.
54. Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC. Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells. *Infect Immun*. 1987 Sep;55(9):2148-54.
55. Guo H, Li R, Zucker S, Toole BP. EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):888-91.
56. Xiang J, Li C, Dong W, Cao Z, Liu L. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 beta. *J Periodontal Res*. 2009 Dec;44(6):784-93.
57. Segulier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol*. 2001 Oct;72(10):1398-406.
58. Smith PC, Munoz VC, Collados L, Oyarzun AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):87-92.
59. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1996 Dec;23(12):1127-32.
60. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res*. 2002 Jun;37(3):196-203.
61. Ogino K, Wang DH. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama*. 2007 Aug;61(4):181-9.
62. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
63. Liu RK, Cao CF, Meng HX, Gao Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2001 Nov;72(11):1545-53.
64. Sheikhi M, Bouhafis RK, Hammarstrom KJ, Jarstrand C. Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis*. 2001 Jan;7(1):41-6.

65. Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini AF, Calandriello M. Enhanced superoxide production with no change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res Commun.* 1991;15(1):11-6.
66. Kimura S, Yonemura T, Kaya H. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 1993 May;28(3):197-203.
67. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, et al. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005 Oct;40(5):378-84.
68. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 30;314(1):197-207.
69. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 2006 Jan;22(1):39-46.
70. Lee YS, Bak EJ, Kim M, Park W, Seo JT, Yoo YJ. Induction of IL-8 in periodontal ligament cells by H₂O₂. *J Microbiol.* 2008 Oct;46(5):579-84.
71. Rossa C, Jr., Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol.* 2005 Oct;24(7):478-88.
72. Kim do Y, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, et al. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res.* 2007 Oct;30(10):1283-92.
73. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988 Jan;67(1):66-70.
74. Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL. Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct;56(10):933-43.
75. Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, et al. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8):1480-90.
76. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4337-41.
77. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;279(6):L1005-28.

78. Chung YM, Lee SB, Kim HJ, Park SH, Kim JJ, Chung JS, et al. Replicative senescence induced by Romo1-derived reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2008 Nov 28;283(48):33763-71.
79. Wang M, Crager M, Pugazhenti S. Modulation of Apoptosis Pathways by Oxidative Stress and Autophagy in beta Cells. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:647914.
80. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jan;280(1):C53-60.
81. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2001 Jan;114(Pt 1):131-9.
82. Ferri N, Garton KJ, Raines EW. An NF-kappaB-dependent transcriptional program is required for collagen remodeling by human smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):19757-64.