



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR ICBM  
LABORATORIO DE ENVEJECIMIENTO Y REPARACIÓN  
TISULAR  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE ENDODONCIA

**EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LOS NIVELES DE MMPs EVALUADOS EN  
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS**

**Alonso Tomás Silva Gallardo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Mónica Cáceres Lluch**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Mauricio Garrido Flores**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 111400064 “Crosstalk between  
gingival fibroblast and macrophages in wound healing during aging” (MC)**

**Santiago – Chile**

**2018**





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR  
ICBM  
LABORATORIO DE ENVEJECIMIENTO Y REPARACIÓN  
TISULAR  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
ÁREA DE ENDODONCIA

**EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LOS NIVELES DE MMPs EVALUADOS  
EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS**

**Alonso Tomás Silva Gallardo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Mónica Cáceres Lluch**

**TUTOR ASOCIADO  
Dr. Mauricio Garrido Flores**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 111400064 “Crosstalk between  
gingival fibroblast and macrophages in wound healing during aging”  
(MC)**

**Santiago – Chile**

**2018**

## DEDICATORIA

*Dedicada a mis padres, Leonardo y Jessica,  
y a mi hermana Constanza.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres, por todo su amor y su infinita preocupación, por estar siempre presentes para que nunca me faltase nada. Por siempre educarme e inculcarme valores, por creer en mí y apoyarme siempre de manera incondicional. Por todos los esfuerzos y por su incesante vocación de padres. Son personas increíbles.*

*A mi hermana, por estar siempre cuidándome y acompañándome. Por ayudarme siempre que lo necesité. Por ser mi guía y modelo a seguir. A pesar de la distancia te siento más que nunca en mi corazón.*

*A mi abuela Amelia, por siempre confiar en mí y por su inmensa generosidad. Por su constante apoyo y cariño. Gracias por siempre impulsarme a seguir adelante.*

*A Francisca, Javiera, María Luisa, Nicole, Josefina, Paulina, Igna y Bego, por ser parte de esta etapa desde el inicio y estar siempre ahí en las risas y en el llanto. Con ustedes el camino es mucho más alegre.*

*A Naomi, porque eres mi amiga del alma, desde siempre. Gracias por acompañarme y alegrarme siempre, por todo el cariño y los buenos momentos.*

*A Daniel, por estar conmigo siempre, en las buenas y en las malas, por siempre darme fuerzas para levantarme y seguir adelante. Por todo el cariño y los gestos de preocupación constante.*

*A Carolina, por tu voluntad y dedicación para ayudarme a que este trabajo fuera posible. Por ser mi compañera de clínica y de carrete también. Te admiro mucho.*

*A todos mis amigos de la universidad, del colegio y de la vida, que han aportado de una u otra manera en mi formación como profesional y como persona.*

*A mi tutora, Dra. Mónica Cáceres, por la oportunidad de participar en este proyecto y realizar este trabajo de investigación. Por su inmensa paciencia para enseñarme y guiarme en este largo proceso. Gracias por todo el apoyo.*

*Al Dr. Mauricio Garrido, por siempre estar ahí para guiarme y apoyarme en el desarrollo de esta tesis.*

*Al equipo del laboratorio de Envejecimiento y Reparación tisular por la ayuda y el acompañamiento, y en especial a María Paz, por su tiempo y paciencia para enseñarme.*

*Finalmente, a la Universidad de Chile, a sus docentes y funcionarios, por formarme y hacerme crecer, por entregarme herramientas para ser un profesional competente y, sobre todo, por entregarme una orientación ética, pluralista, de equidad, y de solidaridad social.*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. MARCO TEÓRICO .....	3
1.1. Proteasas .....	7
1.2. Tejidos Periodontales .....	13
1.3. Fibroblastos .....	15
1.4. Efecto del envejecimiento en la remodelación de la MEC en tejido gingival humano.....	16
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVO GENERAL .....	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Selección de pacientes y obtención de muestras .....	19
5.2. Procesamiento de muestras biológicas para ensayo array de proteasas .....	19
5.3. Procesamiento de muestras biológicas para ensayo de Inmunohistoquímica	20
5.4. Ensayo Array de FGH para Proteasas.....	20
5.5. Inmunohistoquímica cromogénica .....	21
5.6. Análisis estadístico .....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1. Variación en los niveles de proteasas secretadas por FGH en jóvenes y envejecidos medida a través de ensayo Array. ....	23
6.2. Niveles de MMP-3 en tejido gingival de individuos de distintos grupos etarios medidos a través de inmunohistoquímica cromogénica. ....	25
7. DISCUSIÓN .....	28

8. CONCLUSIÓN.....	33
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
10. ANEXOS.....	43
10.1. ANEXO 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	43
10.2. ANEXO 2 Acta de aprobación comité de ética.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Cambios en funciones sistémicas del adulto mayor .....	4
Figura 1. Esquematización estructura de las Metaloproteasas.....	10
Tabla 2. Clasificación MMPs según el tipo de sustrato. ....	12
Figura 2. Tejidos Periodontales .....	14
Figura 3. Tinción de Tricrómico de Masson en tejido gingival humano de distintas edades.....	17
Figura 4. Presencia de proteasas en medio condicionado de FGH.....	23
Gráfico 1. Cuantificación gráfica de la expresión de proteasas en medio condicionado de FGH medido en ensayo Array.....	24
Figura 5. Inmunohistoquímica Cromogénica para MMP-3 en distintos grupos etarios.....	26
Gráfico 2. El Porcentaje de células positivas para MMP-3 aumenta con la edad..	27



## RESUMEN

**Introducción:** El envejecimiento lleva consigo el deterioro de distintas funciones a nivel sistémico. Este proceso se ve reflejado a nivel oral, donde se observa un adelgazamiento y una menor capacidad reparativa de los tejidos periodontales. La reparación tisular y la remodelación de la matriz extracelular (MEC) son procesos mediados por metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs). Durante el envejecimiento, se han observado variaciones en los niveles de expresión y actividad de las MMPs en distintos tejidos, sin embargo, aún se desconoce cómo estos cambios se ven reflejados en el tejido gingival.

**Objetivo:** Determinar la variación en los niveles de MMPs durante el envejecimiento, evaluados en tejido conectivo gingival.

**Metodología:** A partir de medio condicionado obtenido del cultivo de fibroblastos gingivales humanos de sujetos sanos de distintas edades, clasificados en jóvenes y envejecidos, se analizaron los niveles de proteasas secretadas mediante un micro-array de proteínas. Una de las proteasas que aumentó su expresión en el array fue la MMP-3. Para corroborar que MMP-3 efectivamente se sobreexpresa en respuesta al envejecimiento tisular, se analizaron cortes de tejido gingival provenientes de individuos sanos clasificados en jóvenes, mediana edad y envejecidos para evaluar, mediante inmunohistoquímica, la variación en los niveles de expresión tisular de MMP-3 y su distribución en el tejido gingival.

**Resultados:** Al analizar el ensayo array, la mayoría de las proteasas presentaron niveles similares de secreción en ambos grupos, sin embargo, ADAMTS1, Catepsina C, Catepsina L, Catepsina V y MMP-3 mostraron mayores niveles de secreción en el grupo de individuos envejecidos. Por el contrario, los niveles de MMP-10 y MMP-12 se vieron disminuidos en este grupo. Finalmente, un número significativamente mayor de células positivas para MMP-3 fue detectado mediante inmunohistoquímica en el grupo de mediana edad y envejecido en comparación con el grupo joven.

Conclusiones: Los niveles de MMP-3 secretados por fibroblastos gingivales humanos aumentan con el envejecimiento, siendo significativamente mayores a partir del grupo de mediana edad en adelante.

## 1. MARCO TEÓRICO

Nuestro país, al igual que el resto del mundo, está viviendo una etapa avanzada de transición al envejecimiento demográfico. El envejecimiento a nivel poblacional se define como un aumento en el número de adultos mayores, es decir, personas mayores de 60 años de edad. En el año 2007, una de cada diez personas pertenecía al grupo adulto mayor y se espera que para el año 2025 esta proporción sea de uno por cada cinco (Instituto Nacional de Estadísticas 2007). Es de esperar que el proceso de envejecimiento y la transición epidemiológica de nuestra población tengan un gran impacto en el gasto en salud, principalmente en el sistema público, donde se concentra cerca del 80% de la población de adultos mayores (CEPAL. 2004.).

A nivel del individuo, el envejecimiento se define como un proceso fisiológico normal e irreversible, que afecta lenta y progresivamente la adaptabilidad de la persona a su entorno físico, ambiental y social. Se caracteriza por una acumulación de cambios deletéreos que ocurren en las células y tejidos con el avance de la edad y que son responsables del elevado riesgo de enfermedades y de mortalidad (Harman, 2004, Olivares y cols., 2006). A medida que el individuo va envejeciendo, el compromiso sistémico es mayor y más complejo (San Martín, 2002; Millán J, 2011). Es más, de acuerdo al último estudio de discapacidad en nuestro país, el 39% de la población adulta mayor presenta problemas de discapacidad (Departamento de Estudios y Desarrollo, 2006). En la Tabla 1 se resumen los efectos del envejecimiento en los distintos sistemas del organismo.

Los efectos del envejecimiento también se ven reflejados en la cavidad oral, donde existe un deterioro estructural y funcional de los tejidos duros y blandos, lo que se traduce en una mayor dificultad para ejecutar funciones esenciales como la masticación y la deglución. Esto se debe principalmente a una menor eficiencia muscular durante el envejecimiento y a distintas alteraciones en la posición, forma y cantidad de tejido dentario (Sáez y cols., 2007).

**Tabla 1. Cambios en funciones sistémicas del adulto mayor** (San Martín y cols., 2002; Nobili y cols., 2011.)

Sistema	Alteración
Composición corporal	Menor cantidad de agua y masa total magra
	Incremento en la proporción de tejido graso
Sistema Cardiovascular	Aumenta el tiempo de contracción-relajación
	Menor capacidad muscular ventricular izquierda
	Menor respuesta simpática
	Disminuye la elasticidad de los vasos sanguíneos
	Mayor presión arterial y labilidad del control vasopresor
	Mayor porcentaje de arritmias
Sistema Respiratorio	Menor elasticidad pulmonar y capacidad respiratoria
	Menor potencia de la musculatura respiratoria
	Menor respuesta respiratoria a hipoxia e hipercapnia
Sistema músculo-esquelético	Disminuye la potencia y el tono muscular
	Mayor porosidad de corticales óseas
	Menor número y grosor de trabéculas óseas
	Desmineralización paulatina del tejido óseo
Sistema Nervioso Central	Menor flujo sanguíneo
	Aumento en la sensibilidad
	Deterioro en receptores y vías sinápticas
Sistema Renal	Menor masa y flujo sanguíneo
	Disminución en la tasa de filtración glomerular
Sistema Gastrointestinal	Menor aporte sanguíneo
	Menor producción de ácido clorhídrico y pepsina
	Disminución en la motilidad
	Menor tamaño y función hepática
Sistema Inmune	Mayor susceptibilidad a infecciones
Piel	Menor capacidad reparativa
Sistema Sensorial	Presbicia
	Disminución en la audición
	Menor sensibilidad a tonos agudos
	Anosmia y alteraciones del gusto

Particularmente, en el hueso alveolar se produce una resorción marginal paulatina, lo que conlleva una disminución en su altura y grosor, además de un adelgazamiento de la cortical alveolar (Sáez y cols., 2007). Las mucosas se adelgazan debido a la pérdida de elasticidad y a la disminución en la cantidad de tejido graso (San Martín, 2002), al igual que el ligamento periodontal, el cual disminuye su grosor hasta en un 50% (San Martín, 2002). En general, en los tejidos periodontales se observa una disminución en el número de células, fibras colágenas y queratina, (Sáez y cols., 2007).

Dentro de los cambios fisiológicos propios del envejecimiento, se ha descrito un evidente deterioro en la capacidad reparativa de distintos tejidos del organismo, incluyendo los tejidos blandos de la cavidad oral, los que se integran principalmente por la mucosa masticatoria y los tejidos periodontales (San Martín, 2002; Cáceres y cols., 2014; Smith y cols., 2014). La reparación tisular abarca una serie de procesos que ocurren inmediatamente después de la formación de una herida, mediante los cuales se pretende restaurar la función y arquitectura del tejido afectado. (Clark, 1996). La reparación consta de tres etapas:

- 1) Hemostasia e inflamación: Ocurre inmediatamente después de la formación de la herida. Se inicia con la formación del coágulo mediante unión plaquetaria al endotelio para impedir la pérdida de sangre y la colonización bacteriana, y posteriormente con la formación de la malla de fibrina. Las plaquetas liberan citoquinas quimiotácticas para la migración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. (DiPietro y cols., 1998; Gurtner y cols., 2008; Coffman y cols., 2016).
- 2) Formación del Tejido de granulación: Se inicia después del tercer día y se caracteriza por una alta tasa de proliferación y migración celular. Comienza con la migración de queratinocitos en la capa más profunda del epitelio. Se forman nuevos vasos sanguíneos, los cuales, en conjunto con fibroblastos y macrófagos, reemplazan la malla de fibrina con tejido de granulación, el cual provee de sustento al epitelio para migrar, proliferar y madurar. Finalmente, los fibroblastos son estimulados por macrófagos para diferenciarse en miofibroblastos, los cuales cumplen la función de contraer los bordes de la

herida, y, en conjunto con los fibroblastos restantes, secretan colágeno y otros componentes de la MEC (Gurtner y cols., 2008).

- 3) Remodelación de la Matriz Extracelular: Se inicia a partir de la segunda semana desde la formación de la herida y su objetivo es generar una nueva matriz extracelular (MEC) que sea similar a la original. Las células endoteliales, macrófagos y miofibroblastos abandonan el tejido o se eliminan vía apoptosis, dejando un tejido acelular compuesto por colágeno y otros componentes de la MEC. Durante 6 a 12 meses se remodela la matriz compuesta principalmente por colágeno tipo III, el cual es reemplazado por colágeno tipo I. El proceso de remodelación de la matriz es regulado principalmente por metaloproteasas (Gurtner y cols., 2008).

Durante el proceso de reparación tisular, las células responden a las señales inflamatorias mediante la secreción y organización de los distintos componentes de la MEC (colágeno, fibronectina y proteoglicanos, etc.), favoreciendo el reemplazo de los tejidos dañados por nuevos componentes de la matriz. A su vez, esta respuesta celular favorecerá los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular que permiten la re-epitelización, angiogénesis y la posterior remodelación de la matriz neo-formada (Frantz y cols., 2010). Sin embargo, se ha descrito que el envejecimiento afecta las respuestas celulares, observándose una menor proliferación, migración y pluripotencialidad de las células troncales provenientes de tejidos envejecidos, lo cual se traduce en un deterioro en el proceso de reparación y en la calidad de la matriz formada (Zhang y cols., 2012; Smith y cols., 2014). Esta disminución en las respuestas celulares también se ve reflejada en los tejidos periodontales, (Cáceres y cols., 2014) en donde se ha descrito que el envejecimiento afecta distintos procesos biológicos cruciales para la reparación, observándose:

- Disminución en la migración de células epiteliales. (Cáceres y cols., 2014)
- Proliferación celular reducida en ligamento periodontal. (Cáceres y cols., 2014)
- Apoptosis aumentada en tejido gingival. (González y cols., 2011)
- Síntesis de colágeno disminuida en ligamento periodontal. (Ohi y cols., 2006)
- Producción aumentada de metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) en fibroblastos del ligamento periodontal. (Benatti y cols., 2008)

Dentro de los procesos biológicos que comprenden la reparación de los tejidos, la producción de proteasas, en particular MMPs, juega un rol crucial en los procesos de migración celular y remodelación de los componentes de la MEC (Ravanti y cols., 1999).

### **1.1. Proteasas**

Las proteasas o peptidasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos de manera irreversible y están presentes en todos los organismos. Dado que su efecto es irreversible, las proteasas están sometidas a una estrecha regulación en su expresión génica, activación de zimógenos inactivos, bloqueo por inhibidores endógenos, localización en compartimentos específicos (lisosomas, mitocondria, etc.), modificaciones post-traduccionales, proteólisis y degradación. (Clark y cols., 2016; López-Otín y Hunter, 2010; van Domselaar y cols., 2010)

En el ser humano, existen más de 550 proteasas con distintas funciones y sustratos específicos, participando en numerosos procesos celulares. Mediante su acción catalítica regulan la actividad y el destino de numerosas proteínas, controlan su localización extracelular o intracelular, procesan el corte de proteínas de la superficie celular, activan o inactivan otras proteasas y citoquinas y crean nuevas moléculas bioactivas, entre otras funciones. De esta forma, inciden de manera directa en procesos como la replicación y transcripción del DNA, proliferación y diferenciación celular, morfogénesis y remodelación del tejido, angiogénesis, reparación tisular, movilización de células troncales, senescencia y apoptosis.

Además, algunas de ellas juegan un papel determinante en la activación del sistema inmune (López-Otín y Overall, 2002; López-Otín y Bond, 2008; Martino E., 2012).

De acuerdo a la estructura de su sitio activo y su mecanismo catalítico, las proteasas extracelulares se pueden clasificar en seis grupos (López-Otín y Bond, 2008, Martino E.,2012):

- a. Serinproteasas: Contienen una serina en su sitio activo. Participan en funciones del sistema digestivo, como también del sistema inmune. Algunos ejemplos de serinproteasas son la Tripsina, la Quimiotripsina y la Granzima.
- b. Aspartilproteasas: Contienen dos aspartatos en su sitio activo. Ejemplos de aspartilproteasas son la Pepsina y la Renina.
- c. Treoninproteasas: Contienen treonina en su sitio activo y su principal representante es el complejo proteosoma y sus subunidades, presentes al interior de todas las células.
- d. Glutamilproteasas: Contienen glutamato en su sitio activo, sin embargo, no se ha descrito la presencia de estas proteasas en mamíferos.
- e. Cisteínproteasas: Se caracterizan por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Ejemplos de estas proteasas son las Caspasas y la mayoría de las Catepsinas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el cuerpo humano.

Particularmente, las Catepsinas son proteasas lisosomales y endosomales, capaces de digerir proteínas intra y extracelulares, por lo que cumplen un rol importante en los procesos de recambio proteico y autofagia. Por otro lado, también se ha descrito su función como moléculas de señalización celular (Turk y cols.,2012). Algunas catepsinas tales como Catepsina L, S y V tienen un rol sustancial en el procesamiento de antígenos durante la presentación antigénica a LT-CD4<sup>+</sup>. Por otro lado, Catepsina C tiene un rol fundamental en la activación de serinproteasas en neutrófilos y mastocitos, lo que indica que estas proteasas



participarían de manera activa en la respuesta inmuno-inflamatoria (Turk y cols.,2012).

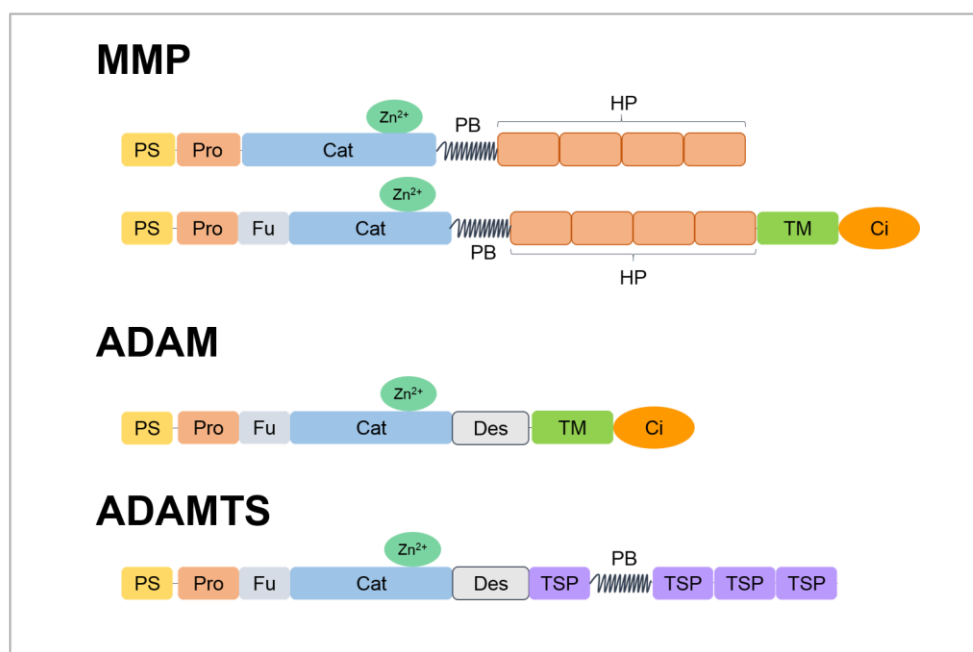
En la actualidad, se sabe que las catepsinas tienen un rol en la remodelación de la MEC, principalmente a través de la actividad elastolítica observada en Catepsina V, sin embargo, su estabilidad en el medio extracelular se ve restringida por el pH y por la inactivación mediada por GAGs (Turk y cols., 2012).

- f. Metaloproteasas: Presentan un metal en su sitio activo, generalmente zinc, mediante el cual realizan su función catalítica (Martino E., 2012). A continuación, abordamos en mayor profundidad esta familia de proteasas, debido a la importancia de su actividad en la remodelación de la MEC.

#### 1.1.1 Metaloproteasas

Las principales enzimas que participan en la remodelación de la MEC son las metaloproteasas, las cuales son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar y/o modificar todos los componentes proteicos de la MEC (Cawston y Young, 2010). Presentan una estructura conservada (Figura 1) caracterizada por un pre-dominio o péptido señal en el amino terminal, un prodominio y un dominio catalítico dependiente de zinc, siendo la presencia del metal en el sitio activo el que da nombre a esta familia. También existe un dominio transmembrana en el caso de las metaloproteasas asociadas a membrana plasmática (Visse y cols, 2003; Page-McCaw y cols, 2007). Todas ellas son inactivas en su forma intacta y requieren de un procesamiento que libere el prodominio, activando el sitio catalítico (Martino. E, 2012).

Existen tres familias de metaloproteasas que son fundamentales en la degradación de la MEC: las ADAMs (metaloproteasas con dominio desintegrina ó *a disintegrin and metalloproteinase*), las ADAMTSs (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats*) y las MMPs o metaloproteinasas de matriz extracelular (Cawston y Young, 2010; Martino E.,2012).



**Figura 1. Esquemática de la estructura de las Metaloproteasas.** Se observa el péptido señal (PS), el prodominio (Pro), el dominio catalítico dependiente de zinc (Cat), el dominio transmembrana (TM), dominio citosólico (Ci), el péptido bisagra (PB), dominio hemopexina (HP) región de corte por furina (Fu), dominio desintegrina (Des) y las repeticiones TSP (Figura adaptada de Martino E., 2012).

Las ADAMs tienen un papel relevante en la espermatogénesis y otros procesos asociados a fertilidad. Contienen en su estructura un dominio tipo desintegrina y un dominio rico en cisteína. Algunas ADAMs procesan gelatina, colágeno y fibronectina, aunque varias tienen capacidad para proteolizar moléculas de señalización celular como TNF $\alpha$  y factores de crecimiento anclados a la superficie celular para permitir su activación (Martino E., 2012; Brocker y cols., 2009).

Por su parte, las ADAMTSs participan en la remodelación de la MEC, la organización del tejido conectivo, la coagulación, la inflamación, angiogénesis y migración celular. Están conformadas por los dominios comunes para todas las metaloproteasas, un dominio desintegrina, un dominio trombospondina (TSP), una región rica en cisteínas, un péptido bisagra y un número variable de repeticiones TSP (Wagstaffy cols., 2011). Su función principal es la degradación de

preteoglicanos como agrecano, versicano y brevicano, así como también el procesamiento del factor von Willenbrand y procolágeno (Apte 2004).

#### 1.1.1.1 **MMPs**

Las MMPs son una de las familias más grandes de proteasas y tienen un rol clave en la interacción entre la célula y su entorno. Permiten regular el comportamiento celular mediante la activación, inactivación y modificación de la actividad de moléculas de señalización, citoquinas y factores de crecimiento. Además, son capaces de crear el espacio necesario para la migración celular, facilitando el proceso de reparación tisular (Sternlicht y cols., 2001).

Las MMPs son secretadas en forma de proenzimas o zimógenos por macrófagos, neutrófilos, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos, entre otros (Gibson y cols., 2009). En la actualidad se conocen 23 tipos de MMPs en los humanos. Todas comparten la estructura básica de las metaloproteasas, sumando un péptido de unión (péptido flexible o en bisagra) y un dominio hemopexina en el carboxilo terminal y presentando dominio transmembrana sólo aquellas MMPs asociadas a membrana plasmática (Visse y cols, 2003; Page-McCaw y cols., 2007).

Las MMPs se clasifican según el sustrato que degradan y de acuerdo a sus diferencias estructurales (Coronato y cols, 2012; Pérez-García 2004), como se puede apreciar en la Tabla 2.

**Tabla 2. Clasificación MMPs según el tipo de sustrato** (adaptado Pérez-García, 2004).

<b>Grupo</b>	<b>MMP</b>	<b>Sustrato</b>
<b>Colagenasas</b>	MMP-1	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X; gelatina, proteoglicanos, entactina, tenascina.
	MMP-8	Colágenos I, II, III, V, VIII y X; gelatina, agregano.
	MMP-13	Colágenos I, II, III, IV, IX, X, XIV; gelatina, tenascina, fibronectina, agregano, osteonectina.
<b>Gelatinasas</b>	MMP-2	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI, XIV; gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agregano, versicano, osteonectina, proteoglicanos.
	MMP-9	Colágenos IV, V, VII, X, XIV; gelatina, elastina, agregano, versican, proteoglicanos, osteonectina.
<b>Estromelisin</b>	MMP-3	Colágenos III, IV, V, IX; gelatina, agregano, versicano, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina.
	MMP-10	Colágenos III, IV, V; gelatina, casina, agregano, elastina, proteoglicanos.
	MMP-11	Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, Colágeno IV, transferrina.
<b>Matrilisin</b>	MMP-7	Colágenos IV y X, gelatina, agregano, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína, transferrina, integrina B, osteonectina, elastina.
	MMP-26	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína.
<b>Metaloproteasas asociadas a membrana</b>	MMP-14	Colágenos I, II, III; caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina.
	MMP-15	Tenascina, fibronectina, laminina.
	MMP-16	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina.
<b>Elastasas</b>	MMP-12	Elastina, fibronectina, Colágeno IV.
<b>Otras</b>	MMP-19	Colágeno I
	MMP-20	Amelogenina, agregano.
	MMP-21	No descrito.
	MMP-22	
	MMP-23	
	MMP-28	
	MMP-29	

Se ha descrito que el envejecimiento produce una variación en los niveles de expresión y actividad de las MMPs en distintos tejidos del organismo. En este contexto, se ha evidenciado un aumento en los niveles plasmáticos de MMP-2 y MMP-7 asociado al avance de la edad (Bonnema y cols., 2007). Cambios similares se han observado en piel y en tejido miocárdico, en donde se ha descrito un aumento de MMP-3 y MMP-9, respectivamente, a raíz del envejecimiento (Meschiari y cols., 2017; Cinque y cols., 2010).

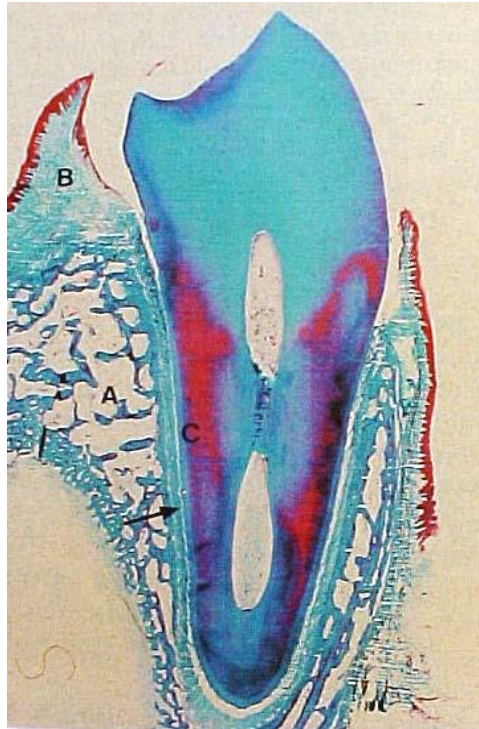
A nivel de los tejidos periodontales, se ha descrito que las células del ligamento periodontal provenientes de individuos de edad avanzada expresan mayores niveles de MMPs, en particular MMP-2 y MMP-8, en comparación con donantes jóvenes (Benatti y cols., 2008). Así mismo, se han descrito variaciones en los niveles de proteasas en condiciones patológicas, como es el caso de la enfermedad periodontal, observándose la expresión de algunas MMPs (-2, -8, -9, -13) significativamente aumentadas en fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis crónica (Hernández y cols., 2007; Baeza y cols., 2016).

## **1.2. Tejidos Periodontales**

El periodonto es una unidad morfo funcional perteneciente al sistema estomatognático, cuya función es soportar, transmitir y distribuir las fuerzas masticatorias, así como también proteger la estructura dentaria (Carranza, 2014). Se compone por cuatro tejidos que permiten la unión del diente al tejido óseo maxilar, los cuales se clasifican en dos grupos (Lindhe, 2009; Carranza, 2014):

- Periodonto de inserción, compuesto por el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar.
- Periodonto de protección, compuesto por la encía, cuya función principal es cubrir y proteger los tejidos subyacentes.

En la Figura 2 se observan las distintas estructuras de los tejidos periodontales.



**Figura 2. Tejidos Periodontales.** Los tejidos periodontales están constituidos por la encía o periodonto de protección (B) y el periodonto de inserción compuesto por cemento (C), ligamento periodontal (→) y hueso alveolar (A) (dato no publicado).

La encía, es el principal componente del periodonto de protección y es la porción de la mucosa masticatoria que recubre el proceso alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Anatómicamente, la encía se divide en marginal, adherida e interdental. En cuanto a la conformación histológica, el tejido gingival se puede dividir en: epitelio gingival y tejido conectivo gingival.

El epitelio gingival corresponde a un revestimiento continuo de epitelio escamoso estratificado. Por otro lado, el tejido conectivo de la encía, también denominado lámina propia, está conformado por dos capas: un estrato papilar subyacente al epitelio y una capa reticular contigua el periostio del hueso alveolar. El tejido conectivo gingival está compuesto por elementos celulares, cuya célula predominante es el fibroblasto gingival, y por elementos extracelulares, entre los que encontramos las fibras (colágenas, reticulares y elásticas) y la sustancia

fundamental, la cual está conformada principalmente por agua, glucosaminoglicanos y proteínas como laminina, fibronectina, trombospondina e integrinas (Carranza, 2014).

### **1.3. Fibroblastos**

Los fibroblastos son las células predominantes del tejido conectivo. Se caracterizan por ser productoras de colágeno y otras moléculas de la MEC. Son células de origen mesenquimal, que poseen una forma ahusada con un núcleo largo y ovalado (Wilkins y cols., 2014) y están distribuidas ampliamente en el cuerpo humano. La función principal de los fibroblastos es la deposición de matriz extracelular, así como también la secreción de las enzimas (metaloproteasas) encargadas de degradarla (Lindner y cols. 2012; Chiquet y cols, 2015).

Los fibroblastos gingivales humanos (FGH) son las células más importantes en el proceso de síntesis del tejido conectivo gingival y, por tanto, esenciales también para el proceso de remodelación y reparación tisular (Hou y Yaeger, 1993; Chiquet y cols, 2015).

Se ha descrito que los FGH derivados de individuos envejecidos exhiben una respuesta proliferativa y migratoria disminuida, sumado a una formación de tejido conectivo y remodelación de colágeno deficientes (Cáceres y cols., 2014). Estos cambios deletéreos en relación con las funciones de los FGH sugieren la presencia de un fenotipo secretor asociado a senescencia celular (SASP), el cual se ha visto ligado a una disminución en la producción de MEC y a un incremento en la secreción de variadas MMPs (Rodier & Campisi, 2011).

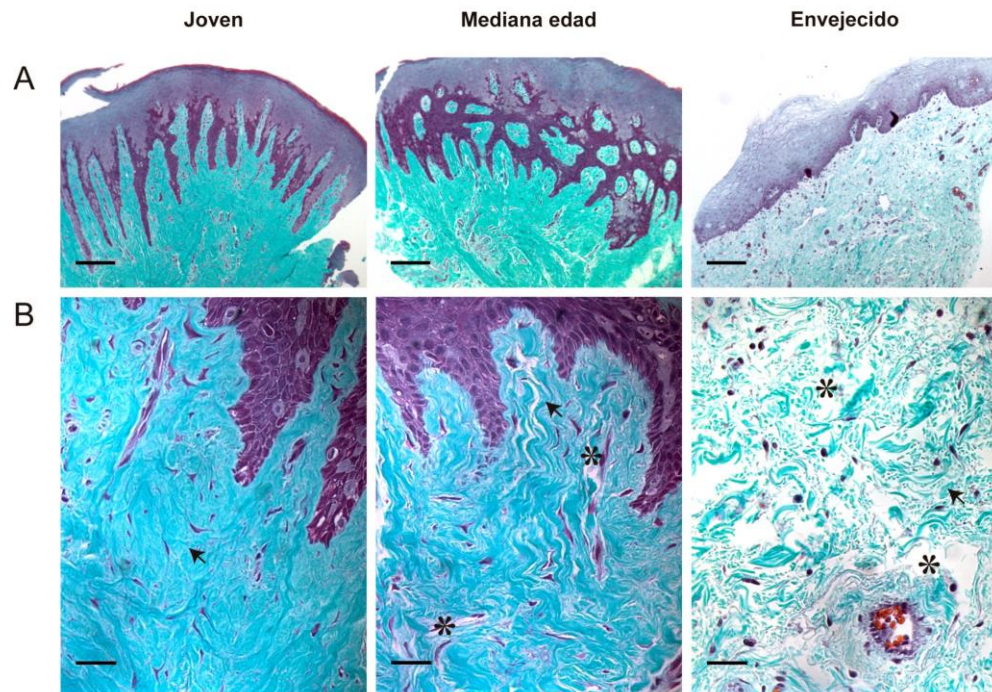
#### **1.4. Efecto del envejecimiento en la remodelación de la MEC en tejido gingival humano.**

A medida que pasan los años, el tejido conectivo gingival, al igual que el resto de los tejidos periodontales, va disminuyendo en grosor y en cantidad de células y fibras colágenas (Sáez y cols., 2007). Datos obtenidos en nuestro laboratorio (datos no publicados) han permitido demostrar que durante el envejecimiento se generan cambios morfológicos significativos en la MEC de tejido gingival humano.

En la Figura 3 se observan microfotografías de muestras de tejido gingival proveniente de individuos de distintas edades, sometidos a tinción con tricrómico de Masson, mediante las cuales se analizaron los cambios que experimenta el tejido conectivo gingival con el envejecimiento. Estos cambios comprenden una disminución significativa en el grosor de los haces de fibras colágenas y un aumento en la cantidad de espacios intersticiales conforme al avance de la edad.

En este ensayo, las muestras se clasificaron según la edad del donante en tres grupos: jóvenes ( $\leq 24$  años), mediana edad (30 a 48 años) y envejecidos ( $\geq 50$  años) de acuerdo a la clasificación descrita en estudios realizados en nuestro laboratorio (Saldías y cols., 2017), la que se basa en diferencias significativas en los niveles séricos de distintas moléculas (TNF- $\alpha$ , MCP-1, PDGF, VEGF e IL-6R) entre los grupos etarios señalados, datos que se correlacionaron con respuestas celulares disminuidas (proliferación, diferenciación y migración celular) y con un proceso de reparación deficiente en tejido gingival proveniente de individuos de mediana edad y envejecidos. Se utilizó esta clasificación en los ensayos empleados en este estudio.





**Figura 3. Tinción de Tricrómico de Masson en tejido gingival humano de distintas edades. (A).** Imágenes representativas de tejido gingival humano de diferentes edades teñidos con la técnica tricrómico de Masson. Barra: 250 µm. Presencia de tejido epitelial (color morado) y tejido conectivo, constituido principalmente por colágeno tipo I (color celeste). **(B).** Aumento mayor de imágenes presentadas en (A), se destaca diferencias morfológicas de la MEC. Barra: 50 µm. (→) Fibras colágenas tipo I (celeste). (\*) Espacio intersticial (espacio en blanco).

En base a los antecedentes expuestos anteriormente, es posible afirmar que el envejecimiento influye de manera negativa en el tejido gingival, alterando la morfología de la MEC y las respuestas celulares que permiten una correcta reparación tisular. Por otra parte, se ha comprobado que el envejecimiento por sí solo, modula los niveles de MMPs en distintos tejidos del organismo, sin embargo, surge la duda de cómo afecta el envejecimiento en los niveles de proteasas secretadas por FGH, en particular MMPs. En este contexto, la determinación de variaciones significativas en el perfil secretor proteolítico de FGH en el envejecimiento facilitaría el estudio de los mecanismos responsables de las alteraciones experimentadas por el tejido conectivo gingival con el avance de la edad.

## 2. HIPÓTESIS

Durante el envejecimiento existe una variación en el perfil secretor de los fibroblastos gingivales humanos, la cual tiende al aumento en los niveles de MMPs secretadas.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar las diferencias en los niveles de MMPs secretados por FGH en el tejido conectivo gingival entre individuos jóvenes, de mediana edad y envejecidos.

## 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar las diferencias en los niveles de proteasas (ADAM, Catepsinas, MMPs y Calicreínas) secretadas por fibroblastos gingivales humanos entre individuos jóvenes e individuos envejecidos.
- b) Evaluar las diferencias en los niveles de expresión tisular de MMP-3 en muestras de tejido gingival humano provenientes de individuos jóvenes, de mediana edad y envejecidos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio es de carácter descriptivo *in vitro* y fue realizado en muestras de tejido gingival humano, cuya obtención fue realizada previa firma del consentimiento informado (**Anexo 1**), aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (095-2014; **Anexo 2**).

## 5.1. Selección de pacientes y obtención de muestras

Para este estudio se incluyeron pacientes ( $n=15$ ) de distintos rangos etarios, clasificados en tres grupos (Saldías y cols., 2017): individuos jóvenes ( $\leq 24$  años;  $n=6$ ), mediana edad (30 a 48 años;  $n=3$ ) e individuos envejecidos ( $\geq 50$  años;  $n=6$ ) que no presentaban antecedentes de enfermedades metabólicas ni trastornos de la coagulación. Se excluyeron pacientes fumadores y pacientes que presentaban enfermedad periodontal. Se consideraron pacientes sanos periodontalmente calificados para este estudio, aquellos que no presentaron sitios con profundidad al sondaje  $>4\text{mm}$ , pérdida de inserción clínica ni sangrado al sondaje.

Las muestras de tejido gingival se obtuvieron a partir del tejido retromolar y tejido gingival adherido a dientes extraídos, principalmente terceros molares, durante exodoncias realizadas a pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile. También se utilizaron muestras provenientes de tejido gingival excedente en cirugía periodontal de alargamiento coronario. Las muestras fueron transportadas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagles minimal essential médium*) al Laboratorio de Envejecimiento y Reparación tisular, ICBM, de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## 5.2. Procesamiento de muestras biológicas para ensayo array de proteasas

Cultivos primarios de FGH fueron obtenidos mediante el método de explante (Larjava y cols., 1989). Un total de ( $n=6$ ) muestras, correspondientes al grupo de jóvenes ( $n=3$ ) y al grupo de envejecidos ( $n=3$ ) se cultivaron en medio de cultivo DMEM en presencia de suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco BRL), 100  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina (Sigma), 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomycin (Sigma) y 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina a 37 °C en 5% de  $\text{CO}_2$  de atmósfera. Se utilizó el medio condicionado de las células en subcultivo 3.

### **5.3. Procesamiento de muestras biológicas para ensayo de Inmunohistoquímica**

Muestras de encía ( $n=9$ ) obtenidas de individuos pertenecientes a los grupos de jóvenes ( $n=3$ ), mediana edad ( $n=3$ ) y envejecidos ( $n=3$ ) fueron fijadas durante 24 horas con Paraformaldehído (PFA) al 4 % p/v pH 7,4 a 4°C, luego fueron deshidratadas con soluciones alcohólicas de grados ascendentes y aclaradas con xilol a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron impregnadas a 60°C con Histosec (Merck) para la obtención de tacos histológicos.

Finalmente, se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, que se adhirieron en portaobjetos cargados (BioGenex) para la realización de técnica inmunohistoquímica. Los portaobjetos con los cortes, fueron debidamente almacenados a 4° C en caja para portaobjetos.

### **5.4. Ensayo Array de FGH para Proteasas:**

Para evaluar las diferencias en los niveles de proteasas secretadas por FGH en muestras provenientes de individuos de distintas edades, se realizó un ensayo Array de proteasas como método exploratorio. Para esto, se utilizó el medio condicionado del cultivo de FGH de individuos pertenecientes al grupo joven ( $n=3$ ) e individuos pertenecientes al grupo envejecido ( $n=3$ ) con el objetivo de identificar las proteasas cuyos niveles varían de forma significativa entre estos grupos etarios.

El análisis se realizó utilizando el kit "*Proteome Profiler Human Protease Array*" (R&D technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit comercial contiene anticuerpos para 34 distintas proteasas, adheridos en duplicado a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas se incubaron durante 1 hora con solución buffer de bloqueo incluida en el kit (Array Buffer 6). A su vez, se mezcló 1mL de cada muestra de medio condicionado con 15 $\mu\text{L}$  de mix de anticuerpos biotinilados de detección presentes en el kit, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se retiró el buffer de bloqueo y las membranas se incubaron con la mezcla de medio condicionado con anticuerpos biotinilados durante 12 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con buffer de lavado contenido en el kit. Luego, las membranas fueron incubadas con HRP (horseradish peroxidase) conjugado con estreptovidina, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con buffer de lavado, tres veces durante 10 minutos. En seguida, las membranas fueron incubadas durante 1 minuto con una solución que contiene peróxido de hidrógeno y luminol. Las membranas fueron reveladas utilizando un fotodocumentador. Finalmente, se evaluaron los niveles de expresión de las distintas proteasas a través de la valoración de la intensidad/área de píxeles utilizando el procesador de imágenes ImageJ-64.

### **5.5. Inmunohistoquímica cromogénica:**

Una vez obtenidos los resultados del ensayo array de proteasas, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica cromogénica, con el fin de analizar la variación en los niveles de MMP-3 en el tejido gingival durante el envejecimiento, debido a la sobreexpresión de esta proteasa evidenciada en las muestras de medio condicionado pertenecientes al grupo de individuos envejecidos. Para este propósito se utilizaron cortes de tejido gingival provenientes de individuos jóvenes ( $n=3$ ), mediana edad ( $n=3$ ) y envejecidos ( $n=3$ ).

Se desparafinaron los cortes de encía, sumergiéndolos secuencialmente por intervalos de 3 minutos en xilol, xilol/etanol, etanol de 100%, etanol de 95%, etanol de 70%, etanol de 50% y finalmente en agua destilada. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica, para lo cual las muestras fueron sumergidas en solución buffer Citrato (Citrato de Sodio 10mM, Tween 0,05% v/v pH 6.0) a 95°C durante 30 minutos.

Para el bloqueo de las enzimas peroxidasas endógenas, las muestras fueron incubadas con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%(v/v) en H<sub>2</sub>O destilada, en cámara húmeda, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron incubadas en solución de bloqueo, compuesta por suero fetal bovino al 10% (v/v) y Tritón X-100

al 0,3 % (v/v) en PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente, para el bloqueo de uniones inespecíficas.

Para la incubación del anticuerpo primario se utilizó anticuerpo para MMP-3, MMP3 Antibody (45H6L22), ABfinity™ Rabbit Monoclonal (1:100, Thermo Fisher, Cat.#:701285), durante toda la noche a 4°C. Para el reconocimiento del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado universal R.T.U. anti-mouse/rabbit IgG (VECTOR Laboratories), durante 30 minutos a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda. Para revelar se utilizó el kit ABC VECTASTAIN Elite (VECTOR Laboratories) y kit DAB sustrato para peroxidasa (VECTOR Laboratories) durante 30 minutos, también en cámara húmeda a temperatura ambiente.

La tinción nuclear se realizó con hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Los cortes fueron deshidratados y montados con Entellán para su posterior observación en el microscopio (Microscopio Optika, Fluo xds-3FL, Italy). Finalmente, se realizó un conteo de las células con marcaje positivo para MMP-3 (tinción amarillo/marrón) utilizando 3 áreas representativas por cada corte de tejido.

El control negativo se realizó siguiendo el mismo protocolo, reemplazando el anticuerpo primario correspondiente por solución de bloqueo.

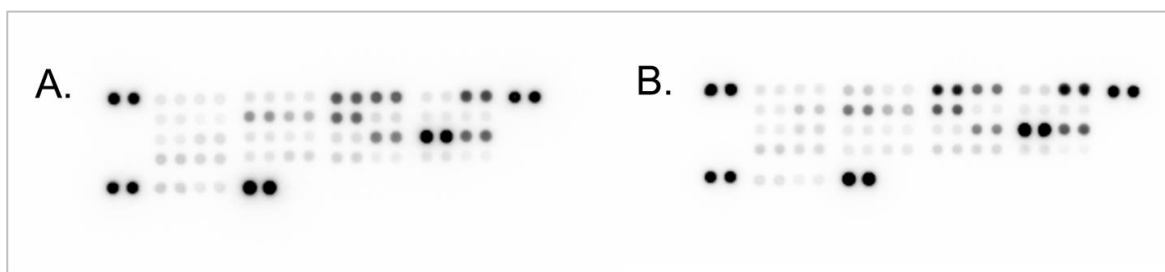
## **5.6. Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron independientemente 3 o más veces. Los datos obtenidos se graficaron usando el software GraphPad Prism 6.0, al igual que el análisis estadístico respectivo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante test no paramétrico Mann-Whitney. Diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Variación en los niveles de proteasas secretadas por FGH en jóvenes y envejecidos medida a través de ensayo Array.

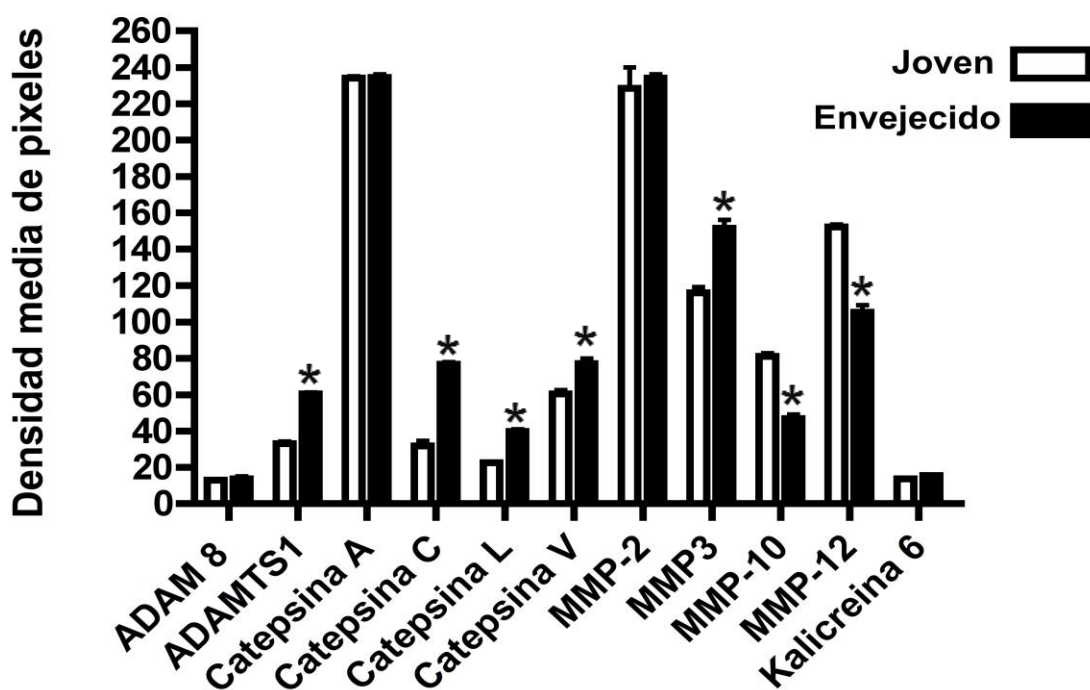
En la Figura 4 podemos observar una imagen representativa de las membranas de nitrocelulosa reveladas, correspondientes al ensayo Array de proteasas "Proteome Profiler Human Protease Array". En ella podemos ver la expresión de 34 distintas proteasas en muestras de medio condicionado de cultivos de FGH obtenidos tanto de individuos jóvenes (Figura 4A.) como de individuos envejecidos (Figura 4B.).



**Figura 4. Presencia de proteasas en medio condicionado de FGH.** Ensayo *Proteome Profiler Human Protease Array*. La figura muestra las membranas reveladas del ensayo array de proteasas incubadas con medio condicionado obtenido de individuos jóvenes (A) y de individuos envejecidos (B).

El análisis de intensidad/área de píxeles (Gráfico 1) arrojó como resultado que existen niveles elevados de las proteasas Catepsina A y MMP-2 secretadas tanto en el grupo de fibroblastos obtenidos de individuos jóvenes como envejecidos. Los niveles de las proteasas ADAMTS1, Catepsina C, Catepsina L, Catepsina V y MMP-3 resultaron ser significativamente mayores en el grupo de individuos envejecidos en comparación con el grupo de individuos jóvenes. Por el contrario, se observó que los niveles de las proteasas MMP-10 y MMP-12 fueron significativamente mayores en el grupo de individuos jóvenes en comparación con el grupo de individuos envejecidos.

Los valores de densidad de pixeles de ADAM8, ADAM9, ADAMTS13, Calicreína (-6, -3, -5, -7, -10, -11, -13), Catepsina (-b, -d, -e, -s, x/z/p), MMP (-1, -7, -8, -9, -13), Neprilisina, Proteinasa-3 y Urokinasa-3 no revelaron diferencias significativas entre ambos grupos, al igual que Catepsina A y MMP-2.



**Gráfico 1. Cuantificación gráfica de la expresión de proteasas en medio condicionado de FGH medido en ensayo Array.** (Promedio +/- DS) El gráfico muestra la cuantificación de la intensidad/área de las bandas positivas para proteasas en ensayo array (*Proteome Profiler Human Protease Array*). Se observa el nivel de expresión de diferentes proteasas presentes en medio condicionado de cultivo de FGH obtenidos de individuos jóvenes y envejecidos. \*Diferencias significativas  $p \leq 0,05$  Mann Whitney en grupo envejecido versus grupo joven.



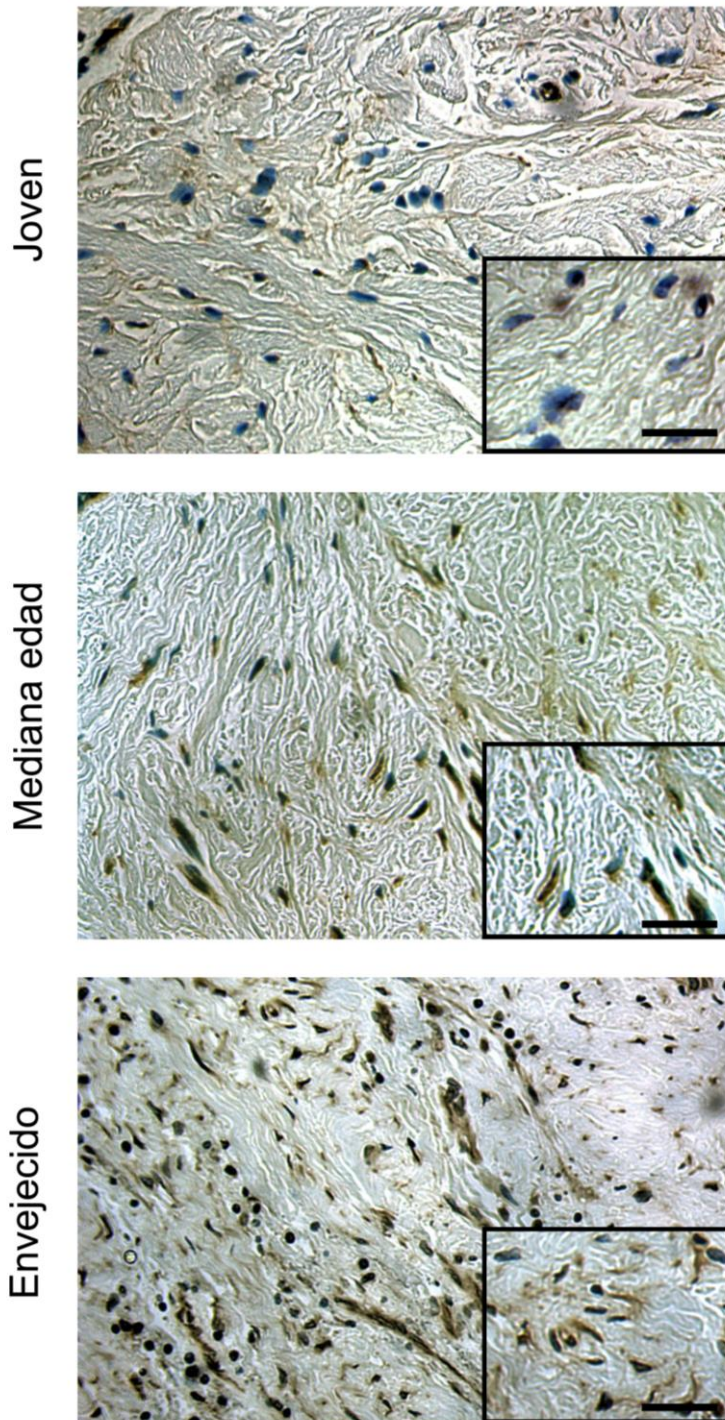
En los resultados del ensayo array de proteasas (Gráfico 1) se observa un aumento significativo de distintas proteasas secretadas por fibroblastos gingivales. Entre éstas, destaca el aumento significativo en los niveles basales de MMP-3, ya que esta proteasa se asocia directa e indirectamente con el metabolismo del colágeno tipo I y III, entre otros componentes de la MEC.

## **6.2. Niveles de MMP-3 en tejido gingival de individuos de distintos grupos etarios medidos a través de inmunohistoquímica cromogénica.**

En la Figura 5 se observa una muestra representativa de los resultados del ensayo de inmunohistoquímica. En ella podemos observar cortes de encía clínicamente sana provenientes de individuos pertenecientes a distintos grupos etarios, las cuales reflejan una diferencia en los niveles de expresión tisular de MMP-3 entre los distintos grupos. Es posible apreciar que, a medida que aumenta la edad, existe un aumento progresivo en la prevalencia de células positivas para MMP-3, marcadas en color amarillo/marrón.

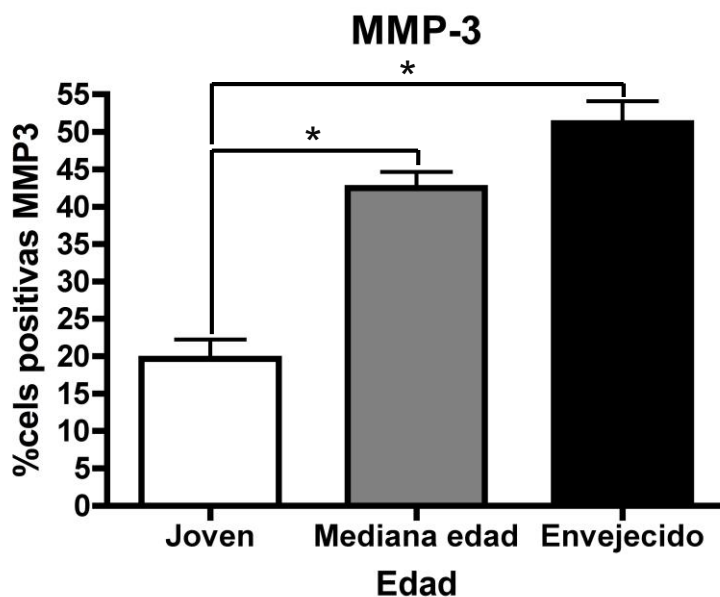
Con el objetivo de graficar los cambios en los niveles de MMP-3 en tejido gingival en grupos de edad más avanzada, se realizó una cuantificación de las células positivas para MMP-3 en relación con el total de células a partir de las microfotografías de la inmunohistoquímica cromogénica presentes en la Figura 5.

## MMP-3



**Figura 5. Inmunohistoquímica Cromogénica para MMP-3 en distintos grupos etarios.** Microfotografía de cortes de tejido gingival de voluntarios de los distintos grupos (jóvenes, mediana edad y envejecidos). Inmunohistoquímica cromogénica para MMP-3. Contraste de núcleo con hematoxilina de Mayer. Las células positivas para MMP-3 se aprecian en tonalidades amarillo/marrón. Los núcleos se aprecian de color azulado. Barra=50  $\mu$ m.

En el Gráfico 2 se observa el porcentaje de células positivas para MMP-3 en cada uno de los grupos: jóvenes (>24 años), mediana edad (30-48 años) y envejecidos (>50 años). Existe un porcentaje significativamente mayor de células positivas para MMP-3 a medida que aumenta la edad. El porcentaje de células positivas para MMP-3 según la cuantificación realizada fue de  $20,18 \pm 2,56\%$  en el grupo joven,  $43,04\% \pm 2,16\%$  en el grupo de mediana edad y  $51,15 \pm 2,95\%$  en el grupo envejecido. (promedio  $\pm$  DS)



**Gráfico 2. El Porcentaje de células positivas para MMP-3 aumenta con la edad.** (Promedio  $\pm$  DS) Cuantificación de células positivas para MMP-3 versus el total de células. El gráfico muestra porcentaje de células positivas para MMP-3 en relación al total de células, cuantificado en el grupo joven, de mediana edad y envejecido. \* Diferencias significativas entre grupo joven y mediana edad ( $p < 0,001$ ), y entre joven y envejecido ( $p < 0,001$ ).

## 7. DISCUSIÓN

El envejecimiento, es un proceso fisiológico que tiene múltiples repercusiones en el organismo, aumentando la vulnerabilidad del individuo a la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas, que menoscaban su salud y calidad de vida (Olivares y cols., 2006). En el caso de los tejidos periodontales, a raíz del envejecimiento se produce un cambio morfológico y funcional progresivo, el cual se evidencia en un menor grosor y una menor capacidad reparativa del tejido gingival en individuos de edad avanzada.

Estudios en nuestro laboratorio (Figura 3) demostraron que a partir de la mediana edad se produce una disminución en el grosor y en la densidad de los haces de fibras colágenas en tejido conectivo gingival, sumado a un aumento significativo en el número de espacios intersticiales, en comparación con individuos jóvenes, lo cual sugiere una alteración en la remodelación de la MEC basado en un desbalance entre la síntesis y degradación de sus componentes.

Este estudio se enfocó en determinar las diferencias en los niveles de MMPs entre grupos de distintas edades, evaluados en tejido gingival y su posible relación con las alteraciones morfofuncionales que ocurren en este tejido con el avance de la edad. Los resultados de este estudio sugieren que existen ciertas proteasas que presentan niveles elevados en el medio condicionado proveniente de cultivos de FGH, independiente de la edad del donante de la muestra. Estas proteasas corresponden principalmente a Catepsina A y MMP-2, las que no varían significativamente sus niveles entre el grupo de jóvenes y el grupo envejecido, al igual que proteasas como ADAM-8 y Kalicreina-6. Por el contrario, ADAMTS1, Catepsina C, Catepsina L, Catepsina V y MMP-3 mostraron niveles significativamente mayores en el grupo de individuos envejecidos. Finalmente, los niveles de las proteasas MMP-10 y MMP-12 mostraron ser significativamente menores en el grupo de individuos envejecidos en comparación con el de individuos jóvenes.

Particularmente, el aumento en los niveles secretados de MMP-3 en el grupo de individuos envejecidos llamó nuestra atención, debido a la importancia de esta

metaloproteasa en la degradación de componentes estructurales de la MEC como fibronectina, gelatina, proteoglicanos, colágeno tipo III y IV, laminina, entre otros (Chin y cols., 1985). Luego de evidenciar que existe un aumento en el nivel basal de MMP-3 secretado por fibroblastos gingivales a medida que aumenta la edad, evaluamos los niveles de MMP-3 *in situ* a nivel tisular en muestras de encía humana mediante la técnica de inmunohistoquímica cromogénica.

La evaluación de las variaciones en los niveles de MMP-3 en muestras de tejido gingival reveló un aumento gradual en el número de células positivas para MMP-3 en tejido conectivo gingival, siendo significativamente mayor en individuos de mediana edad y envejecidos, en comparación con el grupo de individuos jóvenes.

Los datos obtenidos en este estudio nos permiten afirmar que efectivamente existe una relación entre la edad y el perfil secretor proteolítico de los fibroblastos presentes en el tejido gingival, determinado por un aumento en los niveles de proteasas responsables de la degradación de la MEC, en particular MMP-3. Lo anterior sugiere que existiría una mayor tendencia a la degradación de la matriz en el tejido gingival de individuos de edad más avanzada, lo que podría contribuir a la disminución de la capacidad reparativa del tejido gingival descrita en la literatura (Benatti y cols., 2006; Cáceres y cols., 2014). Por otra parte, se ha demostrado que el aumento en los niveles de metaloproteasas en el tejido gingival, sumado a una disminución en el grosor de éste, contribuyen a la pérdida de soporte periodontal y aumentan el riesgo de enfermedad periodontal. (Huttner y cols., 2009).

El rol de MMP-3 en el catabolismo de las proteínas de la MEC está dado, no solo por la unión directa del sustrato con el sitio activo de esta proteasa, sino también a través de la activación de pro-colagenasas tales como MMP-1, MMP-8, MMP-13 y la pro-gelatinasa MMP-9 (Murphy y cols., 1987; Knauper y cols., 1993). Debido a la importancia de MMP-3 en la degradación de la MEC, se ha asociado su sobreexpresión a la destrucción del tejido conectivo durante el desarrollo de distintas patologías, principalmente degenerativas. Se ha descrito un aumento de MMP-3 en patologías tales como enfermedad cardíaca, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple entre otras (Posthumus y cols., 2000; Ma y cols., 2015; Helbecque y cols., 2006; D'Souza y cols., 2002).

Hasta el momento, diversos estudios avalan la existencia de una variación en los niveles de proteasas asociadas al envejecimiento. Yu y cols. (2013) estudiaron la variación en los niveles de expresión de las moléculas involucradas en el metabolismo de la MEC de tendón, y obtuvieron como resultado que la expresión de colágeno tipo I no varía entre los distintos grupos etarios, sin embargo, los niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9 aumentan significativamente en el grupo de individuos de edad más avanzada, lo que podría relacionarse a los cambios degenerativos producidos a nivel de tendón en el envejecimiento.

Estudios similares se han realizado utilizando tejido periodontal, describiéndose un aumento en la expresión de MMP-2 y MMP-8 en ligamento periodontal proveniente de individuos mayores de 60 años (Benatti y cols., 2008)

Un estudio realizado por Komosinska-Vassev y cols. (2011) demostró que existe un aumento progresivo en las concentraciones séricas de MMP-3 conforme al avance de la edad, en individuos sanos, observándose concentraciones significativamente mayores en la tercera, cuarta y sexta década de vida en comparación con la primera. Los resultados de este estudio indicaron que existe una correlación positiva entre los niveles séricos de MMP-3 y la edad, sugiriendo que la remodelación de la MEC también podría mostrar variaciones dependientes de la edad.

Otro estudio describió que, en piel envejecida, existe un aumento drástico en la actividad de MMP-3, asociado a un aumento en la degradación del colágeno (Cinque y cols., 2010). Por otra parte, Quan y Fisher (2015) describieron que la piel de individuos menores de 30 años presenta fibras colágenas abundantes y altamente compactas y organizadas, y que, por el contrario, en piel de individuos mayores de 80 años se observan fibras colágenas fragmentadas y desorganizadas. En este estudio, el aumento en la degradación de colágeno en el tejido se debió principalmente al aumento en la secreción de MMPs.

Los resultados de estos estudios avalan el supuesto de que los cambios en los niveles de MMPs observados en tejido conectivo con el avance de la edad serían, en parte, los responsables del deterioro en la calidad y capacidad de respuesta de los tejidos, lo que sugiere que nuestros resultados podrían estar

relacionados de manera directa con el deterioro en el tejido gingival descrito en el envejecimiento.

A su vez, este deterioro en la calidad de los tejidos podría estar asociado al aumento en la proporción de células senescentes en el organismo durante el envejecimiento, las cuales expresan un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) (Rodier y Campisi, 2011) caracterizado por un aumento significativo en los niveles secretados de más de 40 factores involucrados en señalización celular, teniendo un efecto principalmente pro-inflamatorio en su entorno (Coppé y cols., 2010). Entre los cambios que presentan las células senescentes, destaca la sobreexpresión de proteasas, en particular, MMPs (Millis, 1992), cambio que también pudimos observar en nuestro estudio, sugiriendo que, en definitiva, existiría una relación estrecha entre la senescencia celular, el aumento en los niveles de MMP-3 en FGH provenientes de individuos envejecidos y el deterioro del tejido conectivo gingival observado en el envejecimiento.

Los resultados de nuestro estudio permiten sugerir a MMP-3 como un posible biomarcador de envejecimiento a nivel de tejido conectivo gingival, lo que posibilitaría su uso como un medio para determinar la edad fisiológica del tejido y, por ende, el grado de envejecimiento biológico del mismo, de acuerdo a la clasificación de grupos etarios utilizada en este trabajo. (Xia y cols., 2017; Saldías y cols., 2017).

Determinar la edad fisiológica del tejido gingival permitiría predecir la calidad de la respuesta reparativa de este tejido ante lesiones traumáticas, como también en procedimientos quirúrgicos que involucren tejido gingival y, de este modo, determinar la necesidad de estimular la cicatrización mediante el uso de terapias regenerativas coadyuvantes, tales como el plasma rico en plaquetas (PRP), el que consiste en un concentrado de plaquetas activadas, suspendidas en una porción de plasma con alto contenido de factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis y la reparación tisular (Anitua, 1999; Wang y Avila, 2007). También se utiliza la fibrina rica en plaquetas (PRF) que consiste en una matriz de fibrina que atrapa en su interior plaquetas, factores de crecimiento y citoquinas, y que favorece la

reparación de los tejidos blandos, la angiogénesis, el anclaje de injertos y reduce el tiempo de cicatrización (Naik y cols., 2013; Borie y cols., 2015)

En segundo lugar, permitiría predecir la tendencia a la degradación y al adelgazamiento del tejido periodontal, proceso asociado a un mayor riesgo de recesión gingival, cuya exposición radicular resultante afecta la estética y podría conducir a sensibilidad y caries radicular. También se asocia a un mayor riesgo de enfermedad periodontal y de pérdida de soporte periodontal (Huttner y cols., 2009; García-Rubio y cols., 2015). La estimación de este riesgo nos permitiría intervenir de manera oportuna estableciendo pautas de tratamiento y control periodontal acorde a dicha susceptibilidad.

Sin embargo, se requieren estudios adicionales para validar esta proteasa como un biomarcador de envejecimiento, de acuerdo con los criterios de la AFAR (The American Federation for Aging Research), tales como ser validado en un modelo animal, o poder ser evaluado repetidas veces en un individuo sin producir daño alguno.

Se sugiere ampliar el tamaño de la muestra para futuros estudios, así como también evaluar la influencia de la edad en los niveles de actividad de MMP-3 en el tejido conectivo gingival. Con este fin, se sugieren estudios adicionales que determinen los niveles de la forma activa e inactiva de esta proteasa, en distintos grupos etarios, y evaluar, paralelamente, los niveles de su principal inhibidor tisular, TIMP-1.

Posteriormente, sería de gran utilidad investigar si los resultados de este estudio se ven reflejados en saliva y en fluido gingival crevicular (FGC), lo cual nos proveería de un método diagnóstico no invasivo de la condición periodontal del paciente en relación con los niveles de MMP-3 y el grado de envejecimiento fisiológico.



## **8. CONCLUSIÓN**

Los niveles de MMP-3 secretados por FGH en tejido conectivo gingival son significativamente mayores en individuos pertenecientes a la mediana edad y envejecidos, en comparación con individuos jóvenes.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Anitua E. (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 14:529-535.

Apte S. (2004). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 36, Issue 6, Pages 68-88, ISSN 1570-9639, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>.

Baeza M., Garrido M., Hernández P., Dezerega A., García-Sesnich J., Strauss, F. y cols. (2016). Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: an exploratory study. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(1), 34-45.

Benatti B., Neto J., Casati M., Sallum E., Sallum A. y Nociti F. Jr. (2006). Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats. *J Periodontal Res.* 41(4):329–333.

Benatti B, Silvério K, Casati M, Sallum E, Nociti F. (2008). Influence of aging on biological properties of periodontal ligament cells. *Connect Tissue Res.* 49(6):401–408.

Borie E., Oliví D., Orsi I., Garlet K., Weber B. y Beltrán V. (2015). Platelet-rich fibrin application in dentistry: A literature review. *Int J Clin Exp Med.*;8:7922–9.

Brocker C.N., Vasiliou V. y Nebert D.W. (2009). Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Human Genomics*, 4(1), 43–55. <http://doi.org/10.1186/1479-7364-4-1-43>

Cáceres M., Oyarzun A., & Smith P. (2014). Defective Wound-healing in Aging Gingival Tissue. *Journal of Dental Research*, 93(7), 691-697.

Carranza (2014). *Periodontología Clínica*. 11a Edición. Capítulo 1 pags. 18-28. Capítulo 2, pags. 36 y 40. Capítulo 3, pags. 60, 61 y 62.

Cawston T. y Young D. (2010). Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res* 339: 221–235

CEPAL. (2004). Boletín Demográfico N° 73 América Latina y El Caribe: Estimaciones y proyecciones de población: 1950- 2050.

Chin J.R., Murphy G., Werb Z. (1985). Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloproteinase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J. Biol. Chem.* 260, 12367–12376

Chiquet M., Katsaros C., Kleetsas D. (2015). Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontology* 2000, Vol. 68, 2015, 21–40.

Cinque B., Palumbo P., la Torre C., Melchiorre E., Corridoni D., Miconi G. (2010) Probiotics in aging skin. In: Farage M., Miller K., Maibach H., editors. *Textbook of aging skin*. Springer-Verlag; Berlin. pp. 811–820.

Clark R.A.F. (1996). *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2ª Edición, Capítulo 1, pág. 3. Capítulo 4, pág. 144.

Clark D. P. y Pazdernik N. J. (2016). *Biotechnology*. 2ª Edición, Capítulo 9: “Proteomics”, pág. 295-333.

Coffman J., Rieger S., Rogers A., Updike D. y Yin V. (2016). Comparative biology of tissue repair, regeneration and aging. *NPJ Regenerative Medicine*, 1, 16003–. <http://doi.org/10.1038/npjregenmed.2016.3>

Coppé J.P., Patil C., Rodier F., Sun Y., Muñoz D., Goldstein J. y Campisi J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), e301. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>

Coronato S., Laguens G., Di Girolamo V. (2012). Rol de las Metaloproteinasas y sus inhibidores en Patología Tumoral. *MEDICINA* (Buenos Aires), vol. 72 N° 6, 495-502.

D'Souza C, Mak B, Moscarello MA (2002). The up-regulation of stromelysin-1 (MMP-3) in a spontaneously demyelinating transgenic mouse precedes onset of disease. *J Biol Chem* 277:13589-13596

Departamento de Estudios y Desarrollo, Superintendencia de Salud. (2006). Documento de trabajo impacto del envejecimiento en el gasto en salud: Chile 2002 - 2020.

DiPietro L., Burdick M., Low Q., Kunkel S., y Strieter R. (1998). MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1693–1698.

Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 123(Pt 24):4195–4200.

García-Rubio A., Bujaldón-Daza A. y Rodríguez-Archilla A. (2015). Recesión gingival: diagnóstico y tratamiento. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 27(1), 19-24. <https://dx.doi.org/10.4321/S1699-65852015000100003>

Gibson D., Cullen B., Legerstee R., Harding K.G., Schultz G. (2009) MMP's made easy. *Wounds International*; Volume 1 (Issue 1).

González O., Stromberg A., Huggins P., Gonzalez-Martinez J., Novak M., Ebersole J. (2011) Apoptotic genes are differentially expressed in aged gingival tissue. *Journal of Dental Research*; Vol 90, Issue 7, pp. 880 - 886. Doi: 10.1177/0022034511403744.

Gurtner GC., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. (2008) Wound Repair and Regeneration. *Nature* Vol. 453. Doi: 10.1038/nature07039

Harman D. (2004). The free radical theory of aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. Volume: 5 (Issue 5): 557-561.

Helbecque N., Cottel D., Hermanta X., Amouyel P., (2007). "Impact of the matrix metalloproteinase MMP-3 on dementia." *Neurobiology of Aging* 28(8): 1215-1220.

Hernández M., Martínez B., Tejerina J. M., Valenzuela M. A., & Gamonal, J. (2007). MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(9), 729-735. doi:10.1111/j.1600-051x.2007.01107.x

Hou L. y Yaeger J.A. (1993). Cloning and Characterization of Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 64(12), 1209-1218. doi:10.1902/jop.1993.64.12.1209.

Huttner E., Machado D.C., de Oliveira R., Antunes A. y Hebling E. (2009). Effects of human aging on periodontal tissues. *Special care in dentistry: official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry.*; 29(4):149–55. pmid:19573041.

Instituto Nacional de Estadísticas (2007). Enfoque Estadístico del Adulto Mayor en Chile. *Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadísticas.*

Keles G.C., Gunes S., Sumer A.P., Sumer M., Kara N., Bagci H., y cols. (2006). Association of Matrix Metalloproteinase-9 Promoter Gene Polymorphism With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 77(9), 1510-1514. doi:10.1902/jop.2006.050378

Knäuper V., Wilhelm S.M., Seperack P.K., DeClerck Y.A., Langlely K.E., Osthues A., y Tschesche H. (1993). Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochemical Journal*, 295(Pt 2), 581–586.

Komosinska-Vassev K., Olczyk P., Winsz-Szczotka K., Kuznik-Trocha K., Klimek K. y Olczyk K. (2011) Age- and Gender-Dependent Changes in Connective Tissue Remodeling: Physiological Differences in Circulating MMP-3, MMP-10, TIMP-1 and TIMP-2 Level. *Gerontology*; 57:44-52

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

Lindhe J. (2009). Periodontología clínica. 5a edición. Capítulo 1, pág. 3.

Lindner D., Zietsch C., P. Moritz-Becher P., Schulze K., Schultheiss H.P., Tschöpe C. y cols. (2012). Differential Expression of Matrix Metalloproteases in Human Fibroblasts with Different Origins. *Biochemistry Research International*, vol. 2012.

Lopez-Otin C., y C.M. Overall. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:509-19.

López-Otín C. y Bond J.S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437. <http://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>

Lopez-Otin C. y T. Hunter. (2010). The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. *Nat Rev Cancer.* 10:278-92.

Liu D. y Hornsby P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 67, 3117–3126.

Ma Y., Iyer R., De Castro L., Toba H., Yabluchanskiy A., DeLeon K., Hall M., Lange R., Lindsey M.L. (2015) Chapter 4. Cross-Talk Between Inflammation and Extracellular Matrix Following Myocardial Infarction. In *Inflammation in Heart Failure*. Editors: Blankesteyn WM and Altara R. Elsevier. 67-79.

Martino E. (2012) Implicación de la proteasa ADAMTS1 y sus sustratos en angiogénesis y cáncer. Tesis doctoral. Centro Pfizer, Universidad de Granada. Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada. Granada.

Meschiari C., Ero O., Pan H., Finkel T., Lindsey, M. L. (2017). The Impact of Aging on Cardiac Extracellular Matrix. *GeroScience*, 39(1), 7–18. <http://doi.org/10.1007/s11357-017-9959-9>

Millán J (2011). Gerontología y Geriátría: Valoración e intervención. Capítulo 1 pags. 6, 7 10, 11.

Millis A., McCue H., Kumar S., Baglioni C. (1992) Metalloproteinase and TIMP-1 gene expression during replicative senescence. *Exp Gerontol*; 27(4):425-8.

Murphy G, Cockett M.I., Stephens P.E., Smith B.J., Docherty A.J. (1987). Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J*; 248: 265 – 268.

Naik B., Karunakar P., Jayadev M. y Marshal V. (2013). Role of platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent.*;16:284–93

Nassar M., Hiraishi N., Islam M. S., Otsuki M., Tagami J. (2014). Age-related changes in salivary biomarkers. *Journal of Dental Sciences*, 9(1), 85-90. doi: 10.1016/j.jds.2013.11.002

Navazesh M. y Kumar S.K. (2008). Measuring salivary flow. *The Journal of the American Dental Association*, 139. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0353

Nobili A., Garattini S. y Mannucci P. (2011). Multiple diseases and polypharmacy in the elderly: challenges for the internist of the third millennium. *Journal of Comorbidity*, 1, 28–44.

Ohi T., Uehara Y., Takatsu M., Watanabe M., Ono T. (2006) Hypermethylation of CpGs in the promoter of the COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. *Journal of Dental Research* Vol 85, Issue 3, pp. 245 – 250.

Olivares-Tirado P., Salazar E. (2006). Documento de Trabajo: Impacto del Envejecimiento en el Gasto en Salud: Chile 2002 - 2020. S. d. S. Departamento de Estudios y Desarrollo. Santiago, Chile.

Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 221–233.

Pérez-García L. (2004) Metalloproteinases and the skin. *Actas Dermosifiliográficas*; 95:413-23 - Vol. 95 Núm.7

Posthumus M.D., Limburg P.C., Westra J., Van Leeuwen M.A. y Van Rijswijk M.H. (2000). Serum matrix metalloproteinase 3 in early rheumatoid arthritis is correlated with disease activity and radiological progression. *Journal of Rheumatology*, 27(12), 2761-2768.

Quan T. y Fisher G.J. (2015). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*; 61(5):427-34.

Ravanti L., Häkkinen L., Larjava H., Saarialho-Kere U., Foschi M., Han J. y cols. (1999). Transforming growth factor- $\beta$  induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 274(52):37292–37330.

Rodier F. y Campisi J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*. 192(4), 547–556.

Sáez R., Carmona M., Jiménez Z. y Alfaro X. (2007). "Cambios bucales en el adulto mayor." *Revista Cubana de Estomatología*, 44(4).

Saldías M., Fernández C., Morgan A., Díaz C., Morales D., Jaña F., Gómez A., Silva A., Briceño F., Oyarzún A., Maldonado F., Cerda O., Smith P. y Cáceres M. (2017). Aged blood factors decrease cellular responses associated with delayed gingival wound repair. *PLoS ONE* 12(9): e0184189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184189>

San Martín C. y Villanueva J. (2002). Cambios Sistémicos en el Paciente Adulto Mayor. *Rev Dent Chile*.

Smith P., Cáceres M., Martínez C., Oyarzún A., y Martínez J. (2014). Gingival Wound Healing. an essential response disturbed by aging?. *Journal of Dental Research*, 94(3), 395-402.

Sorsa T., Gursoy U.K., Nwhator S., Hernandez M., Tervahartiala T., Leppilähti J. y cols. (2015). Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 70(1), 142-163. doi:10.1111/prd.12101



Sternlicht M.D. y Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463-516.

Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B. y Turk D. (2012) Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1824, Pages 68-88, ISSN 1570-9639, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>.

Van Domselaar R., de Poot S.A., y Bovenschen N. (2010). Proteomic profiling of proteases: tools for granzyme degradomics. *Expert Rev Proteomics.* 7:347-59.

Visse R. y Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res*; 92: 827-39.

Wagstaff L., Kelwick R., Decock J. y Edwards D. (2011). The roles of ADAMTS metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Front Biosci.* 16:1861-72.

Wang H. y Avila G. (2007). Platelet Rich Plasma: Myth or Reality? *European Journal of Dentistry*, 1(4), 192–194.

Williamson S., Munro C., Pickler R., Grap M.J. y Elswick R.K. (2012). Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults. *Nursing Research and Practice*, 1-4.

Xia X., Chen W., McDermott J. y Han J. (2017). Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Research*, 6, 860. <http://doi.org/10.12688/f1000research.10692.1>

Yu T-Y., Pang J-H., Wu, K., Chen, M.J., Chen, C.H., y Tsai, W.C. (2013). Aging is associated with increased activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in tenocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14, 2. <http://doi.org/10.1186/1471-2474-14-2>

Zhang J., An Y., Gao L.N., Zhang Y.J., Jin Y., Chen F.M. (2012). The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. *Biomaterials*, Volume 33, Issue 29, 2012, Pages 6974-6986.

## 10. ANEXOS

### 10.1. ANEXO 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### **TÍTULO DEL PROYECTO**

“Crosstalk between gingival fibroblast and macrophages in wound healing during aging.”

“Comunicación entre fibroblastos y macrófagos en la reparación durante el envejecimiento”

Nombre del Investigador principal: Mónica Cáceres Lluch

Profesor asistente

Institución: Universidad de Chile. Facultad de Medicina.

R.U.T. 10276185-5

Teléfonos:02-9789537

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “ Comunicación entre fibroblastos y macrófagos en la reparación durante el envejecimiento”

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivo identificar el papel del envejecimiento en la reparación de encía.

El estudio incluirá a un número total de 10 pacientes, de la Clínica odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar será sometido a participar voluntariamente en un estudio que investigará sobre la capacidad de cicatrización de las encías. Esta invitación se generó luego que mi odontólogo tratante me indicara la conveniencia de extraer una pieza dentaria por su mal pronóstico o un alargamiento coronario. Adicionalmente a la extracción de este diente y/o alargamiento coronario, sólo si acepto participar en este estudio, estoy de acuerdo en ser sometido a una evaluación de mis dientes y encías por un odontólogo. Así mismo, acepto que se me tomó una muestra de encía de aproximadamente 3 x 4 x 4 milímetros (mm) durante la extracción dentaria que se ha planificado. La muestra de encía será utilizada para la obtención y cultivo de células. Estas células serán

utilizadas únicamente para el estudio de la cicatrización de las encías y no se realizará ningún tipo de análisis genético con este tejido. Si en el futuro esta muestra es utilizada con otro fin, se me solicitará mi consentimiento. Estas muestras de tejido serán guardadas en un laboratorio dentro del ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El investigador responsable de este laboratorio es la Dra Mónica Cáceres.

**Riesgos:** Los posibles riesgos de estos procedimientos son bajos ya que la muestra de tejido que será extraído es habitualmente eliminada durante este tipo de procedimientos quirúrgicos y no representa un procedimiento adicional a la cirugía ya indicada. Como consecuencia de la extracción dentaria, es posible que ocurra dolor, sangramiento o eventualmente infección de la zona intervenida. Sin embargo, como parte de la planificación de esta cirugía, se indicarán los fármacos apropiados y se darán las indicaciones necesarias para evitar este tipo de complicaciones.

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse al proceso de extracción deberá comunicarlo a la Dra Mónica Cáceres en el teléfono 8-8376403.

**Costos:** El costo de la toma de muestra de tejido gingival que me sea solicitada para este estudio será financiada por el proyecto de investigación. Sin embargo, el costo del procedimiento odontológico por el cual usted está siendo tratado no será cubierto por este estudio.

Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

**Beneficios:** Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio servirá para dilucidar los mecanismos celulares asociados al proceso de envejecimiento.

**Alternativas:** Si Ud. decide no participar en esta investigación recibirá el estudio y tratamiento que se aplica habitualmente, los que también pueden tener efectos adversos (*enumerar si corresponde para permitir compararlos con los descritos para la droga en estudio*)

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** Los posibles riesgos de estos procedimientos son bajos ya que la muestra de tejido que será extraído es habitualmente eliminada durante este tipo de procedimientos quirúrgicos y no representa un procedimiento adicional a la cirugía ya indicada. Como consecuencia de la extracción dentaria, es posible que ocurra dolor, sangramiento o eventualmente infección de la zona intervenida. Sin embargo, como parte de la planificación de esta cirugía, se indicarán los fármacos apropiados y se darán las indicaciones necesarias para evitar este tipo de complicaciones.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigador: Mónica Cáceres Lluch

Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 02-9786714.

monicacaceres@med.uchile.cl

### **Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra

ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Defectos en las respuestas celulares asociadas a la reparación durante el envejecimiento de tejidos periodontales".

_____ Nombre del sujeto Fecha Rut.	_____ Firma
---	----------------

_____ Nombre de informante Fecha Rut.	_____ Firma
--	----------------

_____ Monica Cáceres LI Fecha Rut. 10276185-5	_____ Firma
--	----------------

*Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.*

**10.2. ANEXO 2 Acta de aprobación comité de ética.**



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA**  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



**ACTA DE APROBACIÓN**  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

Con fecha 09 de septiembre de 2014, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

**09 SET. 2014**

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista  
Prof. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética  
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad  
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"COMUNICACIÓN ENTRE FIBROBLATOS Y MACRÓFAGOS EN LA REPARACIÓN DURANTE EL ENVEJECIMIENTO"** y cuyo investigador responsable es la **Prof. Mónica Cáceres L.**, quien desempeña funciones en el **Programa de Biología Celular y Molecular, I.C.B.M., Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.**

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta de aceptación de las autoridades de la institución en que se realizará el estudio*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

**Teléfono: 9788536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**



Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

**09 SET. 2014**

- a) **Carácter de la población estudiada:** Se trata de población no cautiva en un estudio que se desarrollará "invitro".
- b) **Utilidad del Proyecto:** Proyecto muy interesante relacionado con reparación d tejido gingival y la edad del individuo.
- c) **Riesgos y Beneficios:**
  - **Riesgos:** No existen riesgos importantes salvo la extracción de sangre y tiene beneficios a futuro en nuevo consentimiento.
- d) **Protección de los participantes:** Existe un consentimiento informado de fecha 08 de septiembre 2014.
- e) **Notificación oportuna de reacciones adversas:** Sí.
- f) **El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto:** Sí.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento Informado en su versión modificada recibida el 08 de septiembre del 2014, que se adjuntan firmados, fechados y timbrados por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 09 de septiembre de 2014.

  
**Prof. Gina Raineri B.**  
**Secretaria Ejecutiva CEISH**

GRB/mfp  
c.c: Archivo Proy. N° 095-2014

**Teléfono: 9788536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**