

UCH-FC
Biot. molecular
5643f
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**“EFECTOS DEL CONDENSADO DE HUMO DE CIGARRILLO
SOBRE LA REMODELACIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR EN
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

RODRIGO ANDRÉS GONZÁLEZ ACEVEDO

Director de Seminario de Título:
Dr. PATRICIO SMITH FERRER

Marzo, 2012
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por **el Sr. Rodrigo González Acevedo**

“Efectos del condensado de humo de cigarrillo sobre la remodelación de matriz extracelular en fibroblastos gingivales humanos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Patricio Smith Ferrer
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Juan Fernández Hidalgo
Presidente Comisión

Dra. Verónica Palma Alvarado
Evaluadora

Una firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal, con un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile, superpuesto. Debajo de la firma principal, hay otra firma manuscrita más pequeña sobre otra línea horizontal.

Santiago de Chile, Junio de 2012

BIOGRAFIA



Rodrigo nació en Santiago en el año 1982, cursó sus estudios básicos cerca de su hogar en el Colegio Villa Jesús de La Cisterna, donde fue un alumno destacado. Su educación media la curso en el Instituto Nacional donde recibió las

bases para luego ingresar a estudiar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Rodrigo además tiene múltiples aptitudes artísticas, aprendió en la adolescencia a tocar guitarra y ha llegado a componer hermosas creaciones, además de escribir varios cuentos. Aunque es un hombre tímido tiene innatas aptitudes para las relaciones interpersonales, por lo que ha cultivado amistades importantes y un gran amor por largos años. Luego de múltiples vueltas ha llegado hoy a terminar su vida de estudiante para comenzar un nuevo camino en que de seguro se presentaran muchos nuevos desafíos y se abrirán muchas puertas.

DEDICATORIA



"Feel your soul and let it travel all across this world

It's the journey not the destination as we know.

Sometimes it feels like we can't breathe no more

Have to find the hope, let the spirit overcome.

Learn as if you're going to live forever

Live as if you're going to die tomorrow"

SOULFLY, Living Sacrifice

Prophecy, 2004

AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo, que culmina un proceso. En primer lugar a mi tutor, Patricio Smith, por su admirable paciencia y sabiduría, que va mas allá de lo académico. A Nicole Farfán, Rodrigo Arancibia y Mónica Cáceres, por su apoyo, compañerismo y disposición hacia el conocimiento dentro y fuera de un laboratorio. A mis compañeros de carrera: Cinthia S, Lorena P, Mauricio L, Solange LB, Freddy M, Nathalie K y Andrés L, cuyo apoyo fue fundamental para superar cada una de las etapas que me condujeron a este momento.

A mi familia, a cada una de mis tías y tíos, primos, abuelos, amigos, vecinos y hasta desconocidos que me ayudaron en cada momento a superar cada obstáculo, imposible nombrarlos a todos. Agradecer también a todos aquellos que ya no están conmigo, a mi papa, a mis abuelos y personas cuyas vidas fueron una inspiración para mí y me alentaron a continuar y hacer de mi vida algo inolvidable.

Por último agradecer a la mujer de mi vida, Verónica Aguilar, por su apoyo y amor incondicional, comprensión y ayuda, el principio y el fin de todo, sin ella a mi lado nada tiene valor ni sentido.

El presente trabajo de tesis fue financiado bajo el marco del proyecto FONDECYT #061065 a cargo del Dr. Patricio Smith Ferrer.

A todos, muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
2. HIPOTESIS	6
3. OBJETIVOS	7
3.1. Objetivo general	7
3.2. Objetivos específicos	7
4. MATERIALES	8
4.1. Material biológico	8
4.1.1. Anticuerpos	8
4.1.2. Condensado de humo de cigarrillo	9
4.2. Reactivos	10
4.2.1. Medios y suplementos de cultivo	10
4.2.2. Marcadores de peso molecular	10
4.2.3. Inhibidores	11
4.2.4. Material de cultivo	11
4.2.5. Reactivos generales	11
4.3. Instrumentos y equipos	12
5. METODOS	13
5.1. Cultivo celular	13
5.2. Determinación de especies reactivas de oxígeno	13

5.3. Zimografía de caseína	14
5.4. Ensayo de difusión radial	15
5.5. Detección de la activación de MAP quinasas a través de Western-blot	16
5.6. Detección de la producción de uPA mediante Western-blot	18
5.7. Estadística	19
	/
6. RESULTADOS	20
6.1. CHC estimula la producción de uPA y la generación de plasmina	20
6.2. Inhibidores selectivos de las vías ERK1/2 (PD98059) y JNK (SP600125) inhiben la actividad y producción de uPA estimulada por CHC	23
6.3. CHC activa las vías de transducción ERK1/2 y JNK	27
6.4. NAC inhibe la actividad y producción de uPA estimulada por CHC	30
6.5. CHC estimula la generación de ROS	32
7. DISCUSION	34
8. CONCLUSIONES	38
9. BIBLIOGRAFIA	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. CHC estimula la producción de uPA en fibroblastos gingivales humanos	21
Figura 2. CHC estimula la generación de plasmina en fibroblastos gingivales humanos	22
Figura 3. PD98059 inhibe la actividad de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Gráfico de actividad de uPA vs. estímulo de CHC con inhibidor PD98059	24
Figura 4. SP600125 inhibe la actividad de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Gráfico de actividad de uPA vs. estímulo de CHC con inhibidor SP600125	25
Figura 5. PD98059 y SP60125 inhiben la producción de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos	26
Figura 6. CHC activa la vía de transducción ERK1/2 en fibroblastos gingivales humanos	28
Figura 7. CHC estimula activa la vía de transducción JNK en fibroblastos gingivales humanos	29

Figura 8. NAC inhibe la actividad de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos	31
Figura 9. NAC inhibe la producción de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos	32
Figura 10. CHC estimula la generación de ROS, gráfico de fluorescencia vs. tiempo	33

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
µM	Micromolar.
APS	Persulfato de amonio.
CaCl ₂	Cloruro de calcio.
CHC	Condensado de humo de cigarrillo.
CO ₂	Dióxido de carbono.
CuSO ₄	Sulfato de cobre.
DCDHF-DA	2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína-diacetato.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico .
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular.
FG	Fibroblastos gingivales.
g	Unidades de gravedad.
HCl	Ácido clorhídrico.
JNK	Quinasa N-terminal de c-jun.
KCl	Cloruro de potasio.
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio.
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno.
mL	Mililitros.

mm	Milímetros.
mM	Milimolar.
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular.
N	Concentración Normal.
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico.
NAC	N-acetil-cisteína.
NaCl	Cloruro de sodio.
NaF	Fluoruro de sodio.
NaHCO ₄	Peroxicarbonato ácido de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
Nm	Nanómetros.
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno 1.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PTK	Proteínas tirosina-quinasa.
PTP	Proteínas tirosina-fosfatasa.
PVDF	Polifluoruro de vinilideno.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
TBS	Solución salina tamponada con Tris.
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante- β1.
TEMED	Tetrametiletildiamina.
uPA	Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa.
uPAR	Receptor del activador de plasminógeno del tipo uroquinasa.

RESUMEN

La enfermedad periodontal es una patología inflamatoria de origen infeccioso que ocasiona la destrucción del aparato de inserción periodontal y puede llevar a la pérdida de la dentición. La expresión y severidad de la enfermedad están fuertemente moduladas por factores de riesgo como el tabaquismo. El rol del tabaco en la enfermedad periodontal ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que el riesgo de desarrollar periodontitis se encuentra aumentado en presencia de tabaquismo. Por otra parte, el activador de plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA) es una serina-proteasa cuya expresión y actividad han sido vinculadas a la remodelación de la matriz extracelular en lesiones periodontales crónicas y en heridas gingivales en reparación.

En el presente trabajo se estudió la capacidad del Condensado de Humo de Cigarrillo (CHC) para estimular la producción y actividad de uPA en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos y los mecanismos involucrados en este proceso.

Los resultados de esta investigación muestran que CHC provoca un aumento en la producción y actividad de uPA, la activación de plasmina mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de las vías de señalización ERK1/2 y JNK en fibroblastos gingivales humanos. Estos resultados otorgan una primera aproximación hacia la futura aplicación de compuestos antioxidantes como control de la respuesta celular del tejido gingival a la exposición a derivados del humo de cigarrillo.

ABSTRACT

Periodontal disease is an inflammatory condition caused by infection that causes destruction of the periodontal attachment apparatus and can lead to loss of teeth. Prevalence and severity of periodontal disease is strongly modulated by risk factors such as smoking. The role of tobacco in periodontal disease has been extensively studied and has shown that the risk of developing periodontitis is increased in smokers. Moreover, plasminogen activator urokinase (uPA) is a serine-protease which production has been linked to extracellular matrix remodeling in chronic periodontal lesions and gingival wound repair.

In the present study, we analyzed the effect of cigarette smoke condensate (CSC) on the production and activity of uPA in human gingival fibroblasts and the mechanisms involved in this process.

The results of the present study show that cigarette smoke condensate causes increase in the production and activity of uPA, plasmin activation through the generation of reactive oxygen species and activation of the signaling pathways ERK1/2 and JNK in human gingival fibroblasts. These results provide a first approximation to the future application of antioxidant compounds as a control of the cellular response of gingival tissue to exposure of cigarette smoke.

PARTE I

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

La periodontitis corresponde a una enfermedad de naturaleza inflamatoria y de origen infeccioso que puede derivar en la pérdida de la dentición (Genco y col., 1996). Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación de los tejidos periodontales consecutiva a la infección por bacterias patógenas, situación que puede derivar en la destrucción del aparato de inserción periodontal (Williams, 1990; Offenbacher, 1996). Adicionalmente al efecto ocasionado por las bacterias, otros factores han sido vinculados al desarrollo y progresión de periodontitis, entre ellos la herencia (Johnson y col., 1988), el tabaquismo (Haber y col., 1993; Ah y col., 1994; Martínez-Canut y col., 1995) y la diabetes (Pihlstrom y col., 2005).

El tabaquismo ha sido reconocido como un importante factor de riesgo en el desarrollo y progresión de la periodontitis (Grossi y col., 1995; Martínez-Canut y col., 1995; Tomar & Asma, 2000; Bergstrom, 2003; Johnson & Guthmiller, 2007). El hábito de fumar se relaciona con un riesgo más elevado de pérdida de inserción periodontal y destrucción ósea (Grossi y col., 1994; Grossi y col., 1995; Bergstrom, 2003). Aproximadamente la mitad de las periodontitis observadas en individuos bajo 33 años están relacionadas con el hábito de fumar (Linden & Mullally, 1994; Schenkein y col., 1995). También se han documentado efectos negativos en la respuesta a la instalación de implantes óseointegrados y en terapia periodontal quirúrgica o no quirúrgica (Martins y col., 2004; Labriola y col., 2005; Strietzel y col., 2007).

Los fibroblastos son el tipo celular predominante en el tejido conectivo gingival y están involucrados activamente en la formación y destrucción de este tejido en condiciones normales y de enfermedad (Bartold y col., 2000). Para cumplir esta función los fibroblastos gingivales (FG) secretan un gran repertorio de enzimas proteolíticas y de componentes de la matriz extracelular, incluyendo glicoproteínas y proteoglicanos (Bartold y col., 2000). La matriz extracelular es degradada activamente por un gran número de enzimas entre las que se incluye al activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).

uPA es una serina-proteasa que se expresa de manera abundante en lesiones periodontales crónicas y en heridas gingivales en reparación. Su producción se ha vinculado a la remodelación de la matriz extracelular (Kinnby y col., 1999; Xiao y col., 2001) y se ha observado que una producción alterada de uPA puede conducir a una reparación aberrante de heridas, o a la perpetuación de reacciones inflamatorias crónicas en variadas enfermedades o condiciones en las que la remodelación del tejido conectivo juega un rol importante (Carmeliet y col., 1994; Schafer y col., 1994; Lund y col., 1999; Weckroth y col., 2001; Smith & Martínez, 2006). Una de las principales acciones de uPA corresponde a la generación de plasmina mediante el clivaje de un único enlace en el dominio serina-proteasa del plasminógeno, ubicado en el extremo carboxilo terminal de la molécula (Danø y col., 1985).

Por otro lado uPA es capaz de unirse a su receptor de membrana, uPAR, lo que permite concentrar la actividad proteolítica a nivel de la periferia celular, y desencadenar una serie de respuestas independientes a esta actividad al actuar como ligando, entre las que se cuentan proliferación, migración de fibroblastos y quimiotaxis

de neutrófilos polimorfonucleares (Anichini y col., 1994; Resnati y col., 1996). La actividad proteolítica de uPA es regulada por una serpina específica conocida como inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) que puede ser secretada por muchos tipos celulares (Loskutoff & Quigley., 2000; Czekay y col., 2003) y cuya función es inhibir la fibrinólisis producida por plasmina.

Plasmina es otra serina-proteasa con un amplio espectro de actividades, degrada redes de fibrina y participa en la activación de enzimas pertenecientes a la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) que son en su mayoría secretadas en forma de zimógenos inactivos (Danø y col., 1985; Bugge y col., 1996; Sternlicht & Werb, 2001).

Experimentos que han identificado al factor de crecimiento epidérmico (EGF) como importante estímulo en la producción de uPA también determinaron que la quinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2) es la vía de transducción de señales involucrada en este proceso (Aguirre-Guiso y col., 1999). En fibroblastos gingivales humanos se ha mostrado que las rutas de ERK y de la quinasa N-terminal de c-jun (JNK) están involucradas en la producción de uPA luego de estímulo con EGF (Smith y col., 2004). Este estímulo de la producción de uPA puede depender de la adecuada producción y ensamblaje de c-fos y c-jun (componentes moleculares de AP-1) proceso en el cual JNK juega un importante papel a través de la activación de c-jun. También se ha demostrado que JNK puede activar el factor de transcripción ATF-2, el cual, luego de asociarse con c-jun, estimula la expresión de uPA (Shaulin & Karim, 2002). De esta manera, factores que regulan la producción de uPA en FG humanos influyen directamente en la evolución de la reparación de tejidos e inflamación.

La fase particulada del humo de cigarrillo corresponde a una mezcla sumamente compleja de la cual se han identificado, hasta ahora, más de 3.000 compuestos (Wynder & Hoffmann, 1967). Entre estos compuestos se incluyen radicales libres, que están involucrados en muchas de las enfermedades crónicas asociadas al tabaquismo (Pryor, 1982, 1984, 1985). La exposición a humo de cigarrillo estimula la producción de especies radicales de oxígeno (ROS) en neutrófilos (Ryder y col., 1998). Además se ha mostrado que ROS, tanto exógeno como producido enzimáticamente, altera numerosas vías de señalización, incluyendo las proteína-quinasa activadas por mitógeno (MAPK) (Torres, 2003).

Los efectos del tabaquismo en tejidos periodontales han sido atribuidos a diversos procesos, que incluyen: una respuesta inmune deprimida (Graswinckel y col., 2004), funcionamiento alterado de neutrófilos (Pabst y col., 1995; Guntch y col., 2006), flujo sanguíneo disminuido en tejidos gingivales (Morozumi y col., 2004) y metabolismo alterado de componentes de la matriz extracelular (Tipton & Dabbous, 1995). A estas alteraciones se agregan otras como migración, proliferación, adhesión celular y síntesis de colágeno (Tipton & Dabbous, 1995; Giannopoulou y col., 1999; James y col., 1999; Tanur y col., 2000; Chang y col., 2002; Gamal & Bayomy, 2002). Estudios recientes han identificado y descrito efectos de la nicotina y de componentes del humo de cigarrillo en la actividad y expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular (Tomek y col., 1994; Carty y col., 1996; Nordskog y col., 2003; Zhou y col., 2007). Fibroblastos gingivales expuestos a nicotina muestran altos niveles de actividad de colagenasa (Tipton & Dabbous, 1995). La actividad de elastasa derivada de neutrófilos también se incrementa en el fluido crevicular de fumadores cuando se

compara con la de no fumadores (Soder, 1999). Por último, la nicotina puede estimular la degradación de colágeno en FG humanos (Zhou y col., 2007).

Aunque uPA es una fuente fisiológicamente importante de proteólisis extracelular, no existen estudios que hayan evaluado el efecto del humo de cigarrillo en la expresión, producción y actividad de uPA.

En el presente seminario de título se estudiaron los mecanismos moleculares a través de los cuales el Condensado de Humo de Cigarrillo (CHC) puede estimular la producción y actividad de uPA en cultivos primarios de fibroblastos gingivales de origen humano. Para determinar algunos de los mecanismos involucrados en este proceso se exploraron también las vías de transducción de señales que regulan la producción de uPA estimulada por CHC en este tipo celular.

2.- HIPOTESIS

El tabaquismo ha sido reconocido como un factor de riesgo importante en el desarrollo y progresión de la periodontitis, y componentes del humo de cigarrillo han sido relacionados a la degradación de distintos elementos de la matriz extracelular de fibroblastos gingivales. Por otro lado, la producción de uPA se ha vinculado a la remodelación de la matriz extracelular, a través de la generación de plasmina, lo que desencadena la activación de varias metaloproteinasas de matriz. Estos antecedentes permiten plantear la siguiente hipótesis:

“En fibroblastos gingivales humanos, CHC estimula la actividad del sistema uPA mediante la activación de las vías de transducción de señales ERK1/2 y JNK a través de la generación de ROS, provocando la conversión de plasminógeno en plasmina y consecuente degradación de la matriz extracelular”.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general.

Determinar los mecanismos mediante los cuales el Condensado de Humo de Cigarrillo puede estimular la producción de uPA y la remodelación de matriz extracelular en fibroblastos gingivales humanos.

3.2.- Objetivos específicos.

3.2.1 Establecer rangos de dosis-respuesta para CHC sobre uPA en FG humanos cultivados sobre plástico.

3.2.2 Evaluar la generación de plasmina estimulada por CHC en FG humanos.

3.2.3 Determinar la activación de las vías de transducción de señales ERK1/2 y JNK en FG humanos.

3.2.4 Determinar la participación de ROS en la actividad de uPA estimulada por CHC en FG humanos.

3.2.5 Evaluar la generación de ROS estimulada por CHC en FG humanos.

PARTE II

MATERIALES

Y

METODOS

4.- MATERIALES

4.1.- Material biológico.

Explantos de tejido fueron obtenidos desde la zona retromolar de 2 pacientes masculinos y 2 pacientes femeninos, todos no fumadores y con una edad promedio de 20 (± 3) años, mientras se realizaba la extracción de terceros molares en una consulta dental privada en Santiago de Chile. El consentimiento informado fue obtenido de todos los pacientes antes de que la biopsia fuese realizada. Los protocolos utilizados en este estudio han sido aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los pacientes no presentaron señales de inflamación en el tejido retromolar, ni condiciones médicas pre-existentes o ingesta de medicamentos relevantes durante los últimos 6 meses previos al procedimiento de extracción.

4.1.1.- Anticuerpos.

4.1.1.1.- Anticuerpos monoclonales.

- Anti-p-ERK (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-JNK (Upstate Biotechnology).

- Anti-uPA (American Diagnostica).
- Anti- β -actina (Sigma).

4.1.1.2.- Anticuerpos policlonales.

- Anti-ERK (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-p-JNK (Santa Cruz Biotechnology).

4.1.1.3.- Anticuerpos secundarios.

- Anti-ratón peroxidasa (ROCKLAND).
- Anti-conejo peroxidasa (ROCKLAND).

4.1.2.- Condensado de humo de cigarrillo.

El Condensado de humo de cigarrillo (CHC) fue adquirido de Murty Pharmaceutical, Lexington, KY, USA. El CHC fue preparado por el proveedor mediante la utilización de una máquina fumadora de 20 canales Phipps-Bird. El contenido particulado de un cigarrillo estándar de investigación 1R3F de Kentucky (College of Agriculture, 2009) fue recolectado en filtros de fibra de vidrio Cambridge, y la cantidad obtenida de material particulado se determinó por el aumento de peso en el filtro.

El CHC adquirido se presenta como un fino polvo de color oscuro y para su utilización en los experimentos fue disuelto en DMSO a fin de obtener una concentración final de 4% (p/v). Alícuotas de CHC fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de ser utilizadas en los experimentos.

4.2.- Reactivos.

4.2.1.- Medios y suplementos de cultivo.

- Medio esencial mínimo alfa (Gibco Invitrogen).
- Suero fetal bovino (Hyclone).
- Penicilina (Sigma).
- Streptomycin (Sigma).
- Gentamicina (Sigma).

4.2.2.- Marcadores de Peso Molecular.

Marcador de peso molecular de proteínas preteñido Bio-RAD (Ovoalbúmina, 49.78 kDa; BSA, 99.81; β -Galactosidasa, 117.76 kDa; kDa Miosina, 211.24 kDa).

4.2.3.- Inhibidores.

- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidor de serina-proteasas (Sigma).
- Pepstatina, inhibidor de proteasas acidas (Sigma).
- Leupeptina, inhibidor de cisteína/serina-proteasas (Calbiochem).
- Fluoruro de sodio (NaF), inhibidor de serina/treonina-quinasas (MERCK).
- Ortovanadato de sodio, inhibidor de tirosina-fosfatasas (Sigma).
- SP600125, inhibidor de quinasa N-terminal c-jun (JNK) (Biolmol).
- PD98059, inhibidor de MEK-1 (ERK1/2) (Calbiochem).
- N-acetil-cisteína (NAC), atrapador de especies reactivas de oxígeno (Sigma).

4.2.4.- Material de cultivo.

- Placas, tubos de ensayo, material plástico general (Orange Scientific).
- Tubos de ultracentífuga para concentrar medio de cultivo (Millipore).

4.2.5.- Reactivos Generales.

- **AGFA:** Fijador radiográfico, revelador radiográfico.
- **Bio-RAD:** Acrilamida mix 30%.
- **Gibco Invitrogen:** 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína-diacetato (DCDHF-DA), Medio libre de rojo fenol y suero.
- **Calbiochem:** Plasminógeno.
- **Laboratorio Sanderson S.A:** Agua bidestilada.

- **MERCK:** HCl, NaHCO₄, KCl, KH₂PO₄, NaOH, etanol, isopropanol, β-mercaptoetanol, persulfato de amonio (APS).
- **National Institute of Health:** Software de procesamiento de imágenes ImageJ.
- **Nestlé:** Leche descremada.
- **Perkin Elmer:** Kit de quimioluminiscencia para Western-blot ECL.
- **Pierce:** Membranas de transferencia de polifluoruro de vinilideno (PVDF).
- **Spectra MAX, Molecular Devices:** Fluorómetro de microplaca.
- **TCL:** Alcohol 70%, metanol, Tris grado buffer.
- **US Biological:** CuSO₄, SDS, Tritón X-100.
- **Sigma:** Bromuro de etidio, CaCl₂, DMSO, EDTA, Tripsina.
- **WINKLER Ltda:** Agarosa, caseína, NaCl, Na₂HPO₄, NP-40, TEMED, Tween 20.

4.3.- Instrumentos y Equipos.

- Campana de bioseguridad Scientific modelo 1129.
- Incubador Lab-Line, CO₂ automático.
- Cámaras de transferencia Bio-Rad.
- Centrífuga Biofuge prime R Heraeus.
- Lector de ELISA BioTek, modelo Elx-806.

5.- METODOS

5.1.- Cultivo celular.

Cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos fueron establecidos mediante el método del explante (Larjava y col., 1989). Las células fueron cultivadas en medio esencial mínimo alfa conteniendo 10% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de Penicilina, 100 µg/mL de Streptomina y 50 µg/mL de Gentamicina a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Todos los experimentos fueron realizados utilizando células obtenidas entre el cuarto y décimo subcultivos.

5.2.- Determinación de especies reactivas de oxígeno.

Para determinar la capacidad de CHC de producir especies reactivas de oxígeno intracelular en fibroblastos gingivales se realizó un ensayo de fluorescencia.

Brevemente, las células fueron incubadas en 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA) en medio libre de rojo fenol y suero por 30 minutos a 37°C. A continuación, las células fueron estimuladas con 4 µg/mL de CHC durante intervalos de tiempo de: 0, 30, 60 y 180 minutos respectivamente en medio esencial mínimo libre de suero y colorantes para luego ser lisadas con 0,1 N de NaOH. La generación de ROS fue monitoreada mediante ensayo de fluorescencia del lisado celular utilizando un

lector de fluorescencia de microplacas con longitudes de onda de 480 nm y 530 nm para excitación y emisión respectivamente (Benhar y col., 2001).

El DCDHF-DA es una molécula no cargada permeable a las células. En el interior de las células, esta sonda es clivada por esterasas no específicas formando carboxidiclorofluoresceína, la cual es oxidada en presencia de ROS.

5.3.- Zimografía de caseína.

La actividad de uPA secretada en los cultivos celulares fue determinada mediante zimografía caseinolítica (Martínez y col., 1999). Se sembraron sesenta mil fibroblastos gingivales en placas de 24 pocillos para cada condición experimental. Al día siguiente los cultivos fueron dejados en medio libre de suero y luego de 18 horas recibieron un estímulo de inhibidores y CHC por 48 horas. Se realizaron estímulos con CHC en concentraciones de 0,04, 0,4 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acuerdo al experimento, y un grupo de células control fue estimulado con el solvente DMSO para descartar su influencia en el estímulo.

De acuerdo al experimento realizado, las células fueron incubadas con distintos inhibidores para evaluar su efecto frente al estímulo con CHC. Los inhibidores utilizados fueron: SP600125 (inhibidor de JNK) en concentraciones de 1, 2,5 y 5 μM por 30 minutos previo al estímulo con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC, PD98059 (inhibidor de MEK-1) en concentraciones de 10, 20 y 30 μM por 30 minutos previo al estímulo con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

de CHC o N-acetil-cisteína (NAC, atrapador de ROS) en concentraciones de 5 y 10 μM durante 1 hora, previo al estímulo con 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC.

Alícuotas de medio condicionado libre de suero, normalizados por el contenido de proteína medido en el lisado celular, fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con 10% de dodecilsulfato de sodio (SDS), bajo condiciones no reductoras. Posteriormente, el SDS fue removido mediante 3 lavados de 20 minutos cada uno con Triton X-100 al 2,5%, los geles fueron ubicados sobre un gel secundario de agarosa al 1% conteniendo 0,5% de caseína y 1 $\mu\text{g/mL}$ de plasminógeno, y fueron incubados en una cámara húmeda a 37° C por 12 horas.

Luego de teñir el gel con CuSO_4 al 2%, la proteólisis dependiente de plasmina fue detectada como un área transparente sobre un campo blanquecino. La cuantificación de las bandas fue realizada mediante análisis densitométrico.

5.4.- Ensayo de difusión radial.

Para estudiar la activación de plasminógeno en plasmina se realizó un ensayo de difusión radial.

Para este efecto se generó un pocillo en un gel de agarosa al 1% conteniendo 0,5% de caseína y 1 $\mu\text{g/mL}$ de plasminógeno. El pocillo en el gel se logró utilizando la parte posterior de una punta azul (100-1000 μL) para micropipeta como molde. Una

vez preparado el gel, éste fue atravesado con la parte posterior de una punta para micropipeta; la que luego fue cuidadosamente extraída, generando un pocillo en el lugar donde el gel fue atravesado.

Una alícuota del medio condicionado por células estimuladas con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC y control, normalizada por número de células, fue sembrada directamente en un pocillo realizado en el gel. A continuación, este gel fue incubado en cámara húmeda a 37°C durante 12 horas. Finalmente el gel fue teñido con CuSO_4 al 2% para detectar la proteólisis dependiente de plasmina como un área transparente sobre un campo blanquecino (Santibañez y col., 1995).

5.5.- Detección de la activación de MAP quinasas a través de Western-blot.

Fibroblastos gingivales fueron sembrados en placas de 6 pocillos y se utilizaron 400.000 células por cada condición experimental. Luego de 24 horas las células fueron dejadas en medio libre de suero para posteriormente ser estimuladas con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC a intervalos de tiempo de 0, 5, 15, 30, 60 y 180 minutos.

Luego de finalizado el estímulo, las células fueron lisadas con un buffer de lisis compuesto por NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,2%, 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris HCl, pH 7,4; en presencia de PMSF (2 mM), pepstatina (2 mg/mL), leupeptina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), NaF (5 mM) y ortovanadato de sodio (1 mM) a 4°C por 10 minutos. Para optimizar la lisis celular se agitó cuidadosamente la placa y se le

dieron ligeros golpes laterales para facilitar la acción del buffer de lisis. El lisado celular fue centrifugado a 19.000 g por 10 minutos a 4°C y las proteínas del sobrenadante fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% para finalmente ser transferidas a membranas de transferencia de polifluoruro de vinilideno (PVDF).

Las membranas fueron bloqueadas mediante incubación en leche descremada al 10% en solución salina tamponada con Tris (TBS) conteniendo Tween 20 al 0,1% durante 1 hora para luego ser incubadas con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-ERK (1:1.000), anti-p-ERK (1:1.000), anti-JNK (1:1.000), anti-p-JNK (1:1.000) o anti- β -actina (1:5.000), según el experimento realizado. A continuación las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos en el mismo buffer TBS-Tween para retirar el exceso de anticuerpo primario y finalmente fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón peroxidasa (1:5.000) en el caso de anticuerpos primarios monoclonales o anti-conejo peroxidasa (1:10.000) para anticuerpos primarios policlonales.

A continuación las membranas fueron reveladas utilizando el kit de quimioluminiscencia para Western-blot ECL, y los autoradiogramas fueron escaneados y analizados utilizando el software de procesamiento de imágenes ImageJ, que permite hacer cuantificación relativa de las bandas usando la correspondiente señal de fondo para normalizar la medición.

5.6.- Detección de la producción de uPA mediante Western-blot.

Con el fin de evaluar la producción de la proteína activadora de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), se sembraron 1 millón de fibroblastos gingivales para cada condición experimental en placas de cultivo de 60 mm. Luego de 24 horas las células fueron dejadas en medio libre de suero para posteriormente ser estimuladas con CHC y los inhibidores adecuados a cada condición experimental.

De acuerdo al experimento realizado, las células fueron incubadas con distintos inhibidores para evaluar su efecto frente al estímulo con CHC. Los inhibidores utilizados fueron: SP600125 (5 μ M por 30 minutos previo al estímulo con 4 μ g/mL de CHC), PD98059 (30 μ M por 30 minutos previo al estímulo con 4 μ g/mL de CHC) y NAC (10 μ M durante 1 hora, previo al estímulo con 4 μ g/mL de CHC).

Luego de 48 horas de estímulo, 2 mL del medio condicionado resultante de cada tratamiento experimental fueron recolectados y concentrados hasta 200 μ L utilizando tubos de ultracentrífuga para concentrar medio, centrifugando a 1.500 g por 20 minutos a 4°C. Las proteínas contenidas en el medio condicionado concentrado fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% bajo condiciones reductoras y luego transferidas a una membrana de transferencia de PVDF.

Las membranas fueron bloqueadas en leche descremada al 8% en TBS-Tween durante 80 minutos para luego ser incubadas junto al anticuerpo primario contra uPA

(1:1.000). A continuación las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón peroxidasa (1:5.000) y finalmente reveladas utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL. Los autoradiogramas fueron escaneados y las bandas fueron analizadas utilizando el software de procesamiento de imágenes ImageJ.

5.7.- Estadística.

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar. La validez estadística de cada grupo de resultados fue monitoreada mediante el uso del test de t de student para datos no pareados con distribución Gaussiana, con un nivel de exigencia de $p < 0,05$.

PARTE III

RESULTADOS

6.- RESULTADOS

6.1.- CHC estimula la producción de uPA y la generación de plasmina.

Con el propósito de evaluar la capacidad de CHC para inducir la producción de uPA en FG humanos, se realizó un estímulo con distintas concentraciones de CHC, y el medio condicionado fue analizado mediante zimografía de caseína.

En la Figura 1 se aprecia la capacidad de CHC para estimular de manera dosis-dependiente la actividad de uPA en FG humanos. El estímulo de FG con una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC provocó un aumento en la actividad de uPA de 3,3 veces comparada con su actividad basal. Este resultado es estadísticamente significativo luego de analizar densitométricamente las bandas de degradación en 3 experimentos independientes ($p < 0,05$).

Para determinar si este aumento en la actividad de uPA induce un aumento en la conversión de plasminógeno en plasmina se analizó el medio de cultivo condicionado de FG estimulados con CHC, mediante ensayo de difusión radial.

En la Figura 2 se muestra que el estímulo de FG con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC produjo un aumento en la generación de plasmina, observado a través de un halo de degradación de mayor intensidad y radio que el mostrado por el medio condicionado de células no estimuladas con CHC.

El análisis del diámetro de los halos muestra un aumento estadísticamente significativo luego de analizar la respuesta en 3 experimentos independientes con un valor de $p < 0,05$.

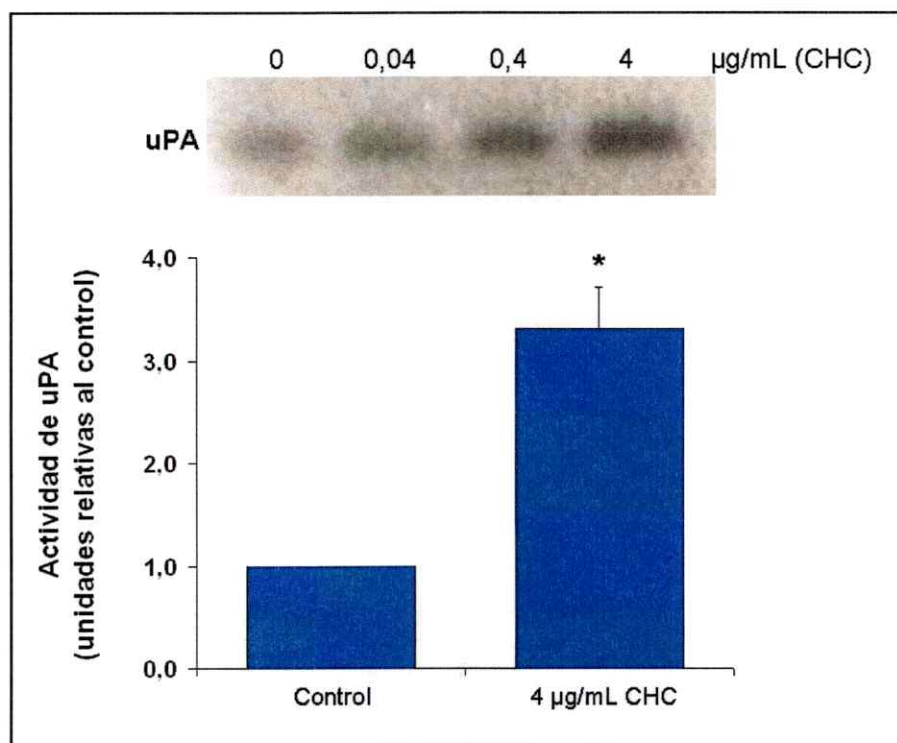


Figura 1.- CHC estimula la producción de uPA en fibroblastos gingivales humanos. Zimografía de caseína de medio condicionado libre de suero de fibroblastos gingivales estimulados con 0,04, 0,4 y 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC por 48 horas, mostrando la estimulación en la producción de uPA por CHC de manera dosis-dependiente. El gráfico presenta un análisis semicuantitativo de las bandas de degradación obtenidas en 3 experimentos independientes, mostrando el promedio de los análisis densitométricos de las bandas y el error estándar. El * indica diferencia estadística significativa entre control y células estimuladas con 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC (test de t de Student, $p < 0,05$). CHC=Condensado de humo de cigarrillo.

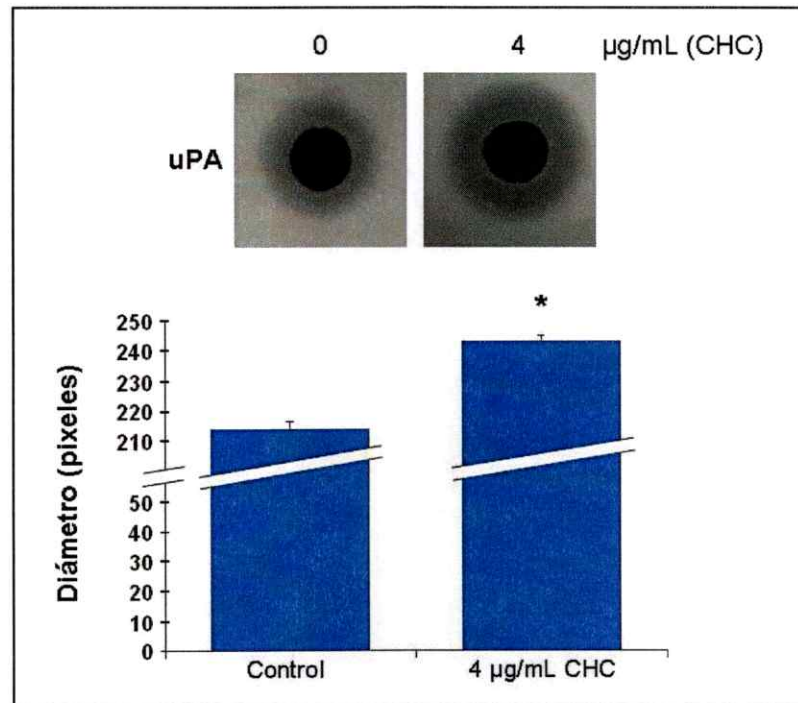


Figura 2.- CHC estimula la generación de plasmina en fibroblastos gingivales humanos. Ensayo de difusión radial de medio condicionado libre de suero de fibroblastos gingivales estimulados con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC por 48 horas, mostrando el aumento en la generación de plasmina por CHC. El gráfico presenta un análisis cuantitativo de los halos de degradación obtenidos en 3 experimentos independientes, mostrando el promedio de los diámetros de los halos de degradación y el error estándar. El * indica diferencia estadística significativa entre control y células estimuladas con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC (test de t de Student, $p < 0,05$). CHC=Condensado de humo de cigarrillo.

6.2.- Inhibidores selectivos de las vías ERK1/2 (PD98059) y JNK (SP600125) inhiben la actividad y producción de uPA estimulada por CHC.

Con el fin de determinar la participación de la vía de transducción de señales ERK1/2 en la producción de uPA mediada por CHC, se realizó un estímulo de FG humanos con CHC, pre-tratando las células durante 30 minutos con el inhibidor selectivo de la proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (MEK-1) PD98059. El medio condicionado fue analizado mediante zimografía de caseína.

La Figura 3 muestra que CHC produjo un aumento en la actividad de uPA en FG humanos y este fenómeno disminuyó en presencia del inhibidor PD98059. Una concentración de 30 μ M del inhibidor no afectó los niveles basales de actividad de uPA, pero si inhibió la actividad de uPA estimulada por CHC. Este resultado es estadísticamente significativo producto del análisis densitométrico de las bandas de degradación en 3 experimentos independientes ($p < 0,05$).

Para determinar el rol de JNK en la producción de uPA estimulada por CHC, FG humanos fueron expuestos durante 30 minutos al inhibidor selectivo de JNK, SP600125 para posteriormente recibir un estímulo de CHC. Finalmente el medio condicionado fue analizado mediante zimografía de caseína.

En la Figura 4 se observa que la actividad basal de uPA fue inhibida por 5 μ M de SP600125, mientras que la actividad de uPA dependiente de CHC lo fue a concentraciones de 2,5 y 5 μ M de SP600125. Ambos resultados son estadísticamente

significativos ($p < 0,05$) luego del análisis densitométrico de las bandas de degradación en 3 experimentos independientes.

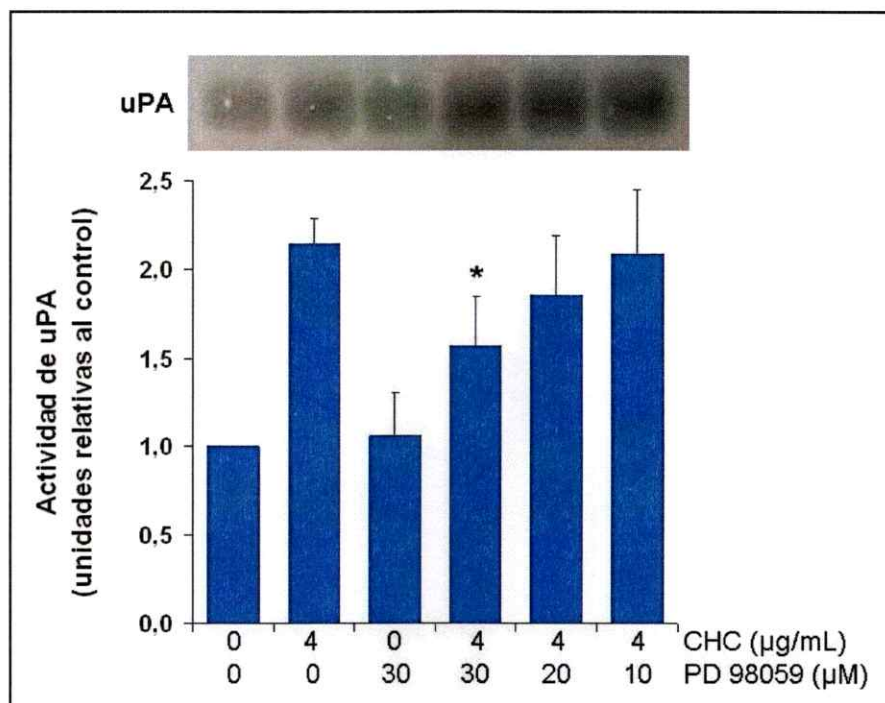


Figura 3.- PD98059 inhibe la actividad de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Gráfico de actividad de uPA vs. estímulo de CHC con inhibidor PD98059. Zimografía del medio condicionado libre de suero de fibroblastos gingivales estimulados con 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC por 48 horas en presencia del inhibidor PD98059 (10, 20 y 30 μM), mostrando la inhibición producida por PD98059 sobre la actividad de uPA estimulada por CHC. El gráfico presenta un análisis densitométrico de las bandas de degradación obtenidas en 3 experimentos independientes, mostrando el promedio de las bandas y el error estándar. El * indica diferencia estadística significativa entre células estimuladas con CHC y células tratadas con 30 μM de PD98059 previo a CHC (test de t de Student, $p < 0,05$). CHC=Condensado de humo de cigarrillo, uPA=Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa.

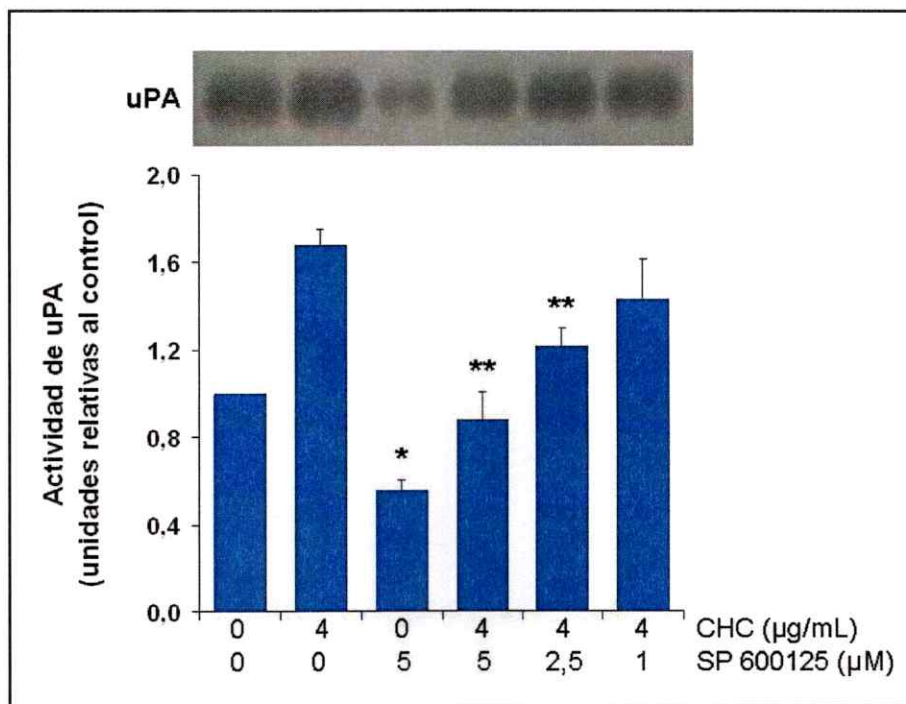


Figura 4.- SP600125 inhibe la actividad de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Gráfico de actividad de uPA vs. estímulo de CHC con inhibidor SP600125. Zimografía de medio condicionado libre de suero de fibroblastos gingivales estimulados con 4 µg/mL de CHC por 48 horas en presencia del inhibidor SP600125 (1, 2,5 y 5 µM), mostrando la inhibición producida por SP600125 sobre la actividad de uPA basal y estimulada por CHC. El gráfico presenta un análisis densitométrico de las bandas de degradación obtenidas en 3 experimentos independientes, mostrando el promedio de las bandas y el error estándar. El * indica diferencia estadística significativa entre control y células tratadas con 5 µM de SP600125. El ** indica diferencia estadística significativa entre células estimuladas con CHC y células tratadas con 2,5 y 5 µM de SP600125 previo al estímulo con CHC (test de t de Student, $p < 0,05$). CHC=Condensado de humo de cigarrillo, uPA=Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa.

Con el objetivo de confirmar la participación de las vías de transducción de señales de ERK y JNK en la producción de uPA inducida por CHC en FG, células fueron tratadas por 30 minutos con los inhibidores PD98059 y SP600125, para luego estimular con CHC. La producción de uPA fue determinada mediante Western-blot del medio condicionado concentrado.

Como se muestra en la Figura 5, el estímulo con CHC (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produjo un aumento de la producción de uPA en FG, mientras que el tratamiento con PD98059 (30 μM) y con SP600125 (5 μM) provocó una importante disminución en los niveles de proteínas de uPA presentes en el medio condicionado de FG estimulados con CHC.

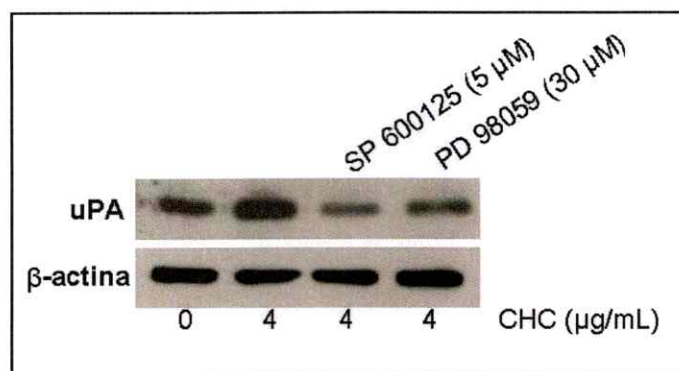


Figura 5.- PD98059 y SP600125 inhiben la producción de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Western-blot de medio condicionado concentrado de fibroblastos gingivales estimulados durante 48 horas con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC en medio libre de suero en presencia de los inhibidores PD98059 (30 μM) y SP600125 (5 μM). La imagen muestra el aumento en la producción de uPA estimulada por CHC y el efecto regulador de los inhibidores PD98059 y SP600125 sobre su producción mediada por CHC. Se incluye β -actina como control de carga. CHC=Condensado de humo de cigarrillo, uPA=Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa.

6.3.- CHC activa las vías de transducción ERK1/2 y JNK.

Con el fin de determinar la capacidad de CHC para activar las vías de transducción de señales, ERK1/2 y JNK, se realizaron curvas de activación para ambas vías de señalización. FG humanos fueron estimulados con CHC durante distintos intervalos de tiempo. La fosforilación de las quinasas ya mencionadas fue evaluada mediante ensayo de Western-blot.

Como se puede apreciar en la Figura 6, el estímulo de FG con 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC produjo una activación de la vía de señalización de ERK a través de la fosforilación de esta quinasa, fenómeno que se extendió entre los 15 y los 60 minutos luego de realizado el estímulo para decaer luego de 3 horas. El gráfico representa el promedio de los resultados obtenidos luego de 3 experimentos independientes.

Por otro lado, el estímulo de FG con 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC provocó la activación de JNK, mediante su fosforilación. Como se aprecia en la Figura 7, este proceso se extiende desde los 5 minutos luego del estímulo hasta sobrepasar las 3 horas. El gráfico muestra el promedio de los resultados obtenidos luego de 3 experimentos realizados de manera independiente.

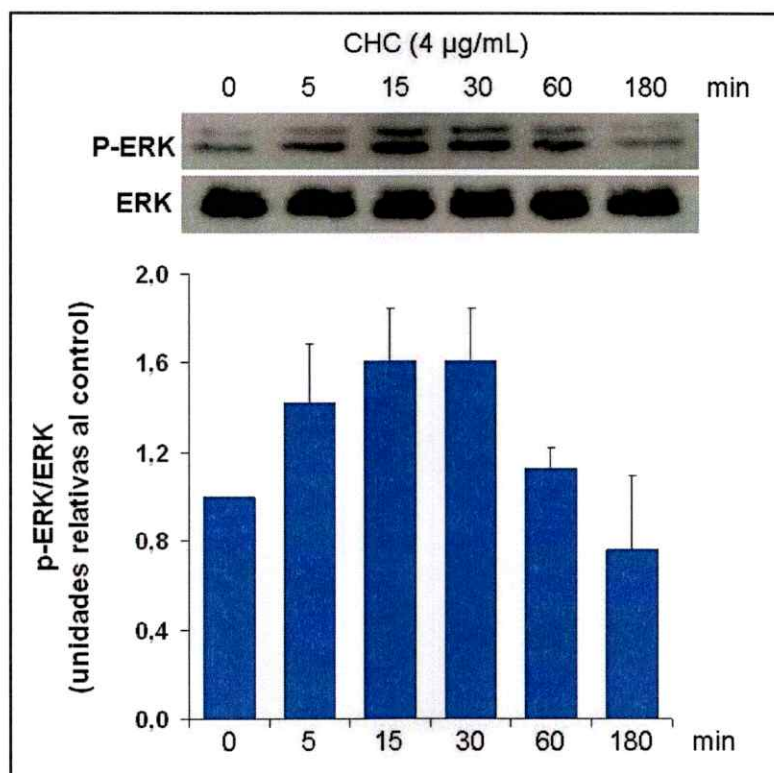


Figura 6.- CHC activa la vía de transducción ERK1/2 en fibroblastos gingivales humanos. Western-blot de lisado celular de fibroblastos gingivales estimulados con 4 µg/mL de CHC en medio libre de suero por 0, 5, 15, 30, 60 y 180 minutos. La imagen superior muestra el aumento de la forma fosforilada de la quinasa ERK1/2, mientras la imagen inferior muestra ERK1/2 total como control de carga. El gráfico presenta un análisis semicuantitativo de las bandas de la forma fosforilada de ERK normalizada por las bandas de ERK total, mostrando el promedio y error estándar relativo al control (minuto 0), obtenido luego de 3 experimentos independientes. CHC=Condensado de humo de cigarrillo, p-ERK=Forma fosforilada de ERK.

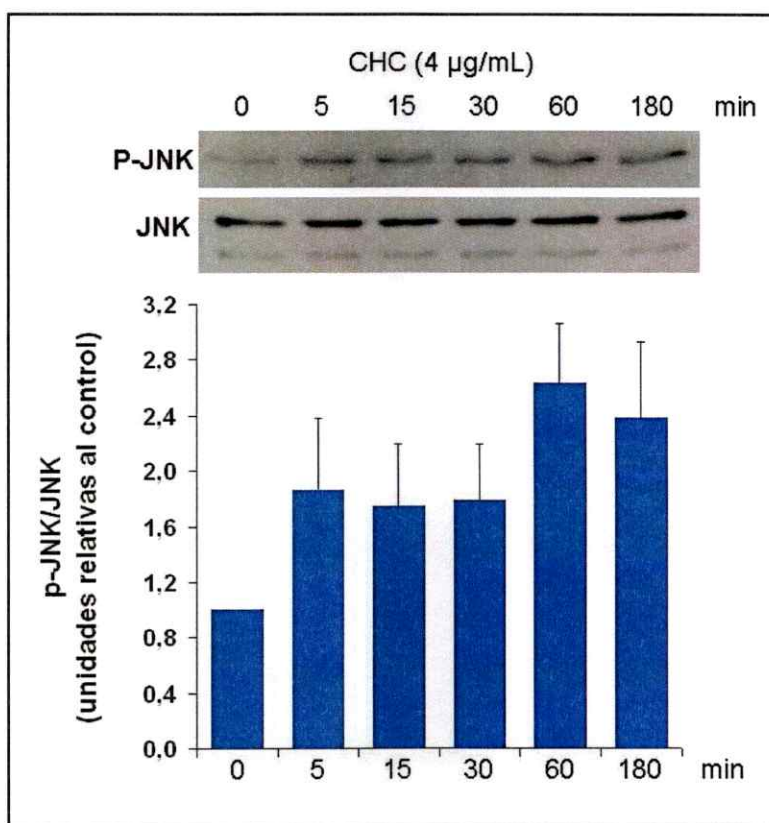


Figura 7.- CHC activa la vía de transducción JNK en fibroblastos gingivales humanos. Western-blot de lisado celular de fibroblastos gingivales humanos estimulados con 4 µg/mL de CHC en medio libre de suero por 0, 5, 15, 30, 60 y 180 minutos. La imagen superior muestra el aumento de la forma fosforilada de la quinasa JNK, mientras la imagen inferior muestra JNK total como control de carga. El gráfico presenta un análisis semicuantitativo de las bandas de la forma fosforilada de JNK normalizada por las bandas de JNK total, mostrando el promedio y error estándar relativo al control (minuto 0), luego de 3 curvas de activación obtenidas de manera independiente. CHC=Condensado de humo de cigarrillo, p-JNK=Forma fosforilada de JNK.

6.4.- NAC inhibe la actividad y producción de uPA estimulada por CHC.

Con el propósito de evaluar la influencia de la generación de ROS en la actividad de uPA estimulada por CHC, se realizó un estímulo de FG humanos con CHC, pre-incubando las células durante 1 hora con el atrapador de especies radicales de oxígeno, NAC. A continuación el medio condicionado de cada condición experimental fue analizado mediante zimografía de caseína.

La Figura 8 muestra que NAC (10 μ M) inhibió efectivamente la actividad basal de uPA en FG sin estímulo de CHC, mientras que concentraciones de 5 y 10 μ M de NAC disminuyeron la actividad de uPA dependiente de CHC en FG. Ambos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,05$), producto del análisis densitométrico de las bandas de degradación en 3 experimentos independientes.

Con el propósito de confirmar el papel que cumple la generación de ROS en la producción de uPA inducida por CHC en FG, cultivos celulares fueron tratados con NAC durante 1 hora para luego recibir un estímulo de CHC. La producción de uPA fue determinada mediante Western-blot del medio condicionado concentrado.

En la figura 9 se muestra que el estímulo con CHC (4 μ g/mL) produjo un aumento de la producción de uPA en FG, mientras que el tratamiento con NAC (10 μ M) provocó una importante disminución en los niveles de uPA presentes en el medio condicionado de FG estimulados con CHC.

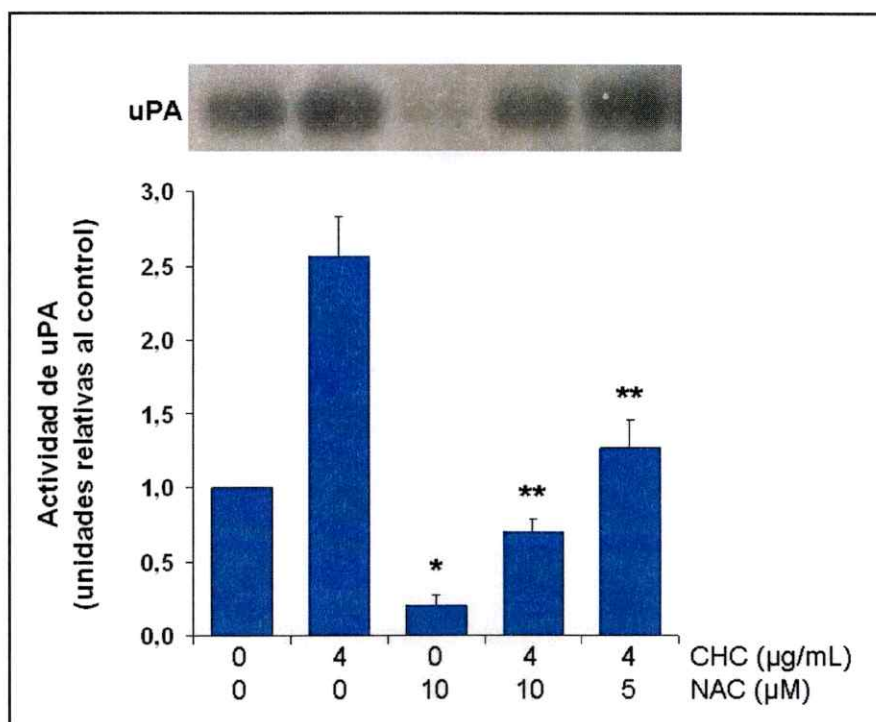


Figura 8.- NAC inhibe la actividad de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Zimografía de medio condicionado libre de suero de fibroblastos gingivales estimulados con 4 µg/mL de CHC por 48 horas en presencia de NAC (5 y 10 µM), exhibiendo la inhibición producida por NAC sobre la actividad de uPA estimulada por CHC. El gráfico presenta un análisis densitométrico de las bandas de degradación obtenidas en 3 experimentos independientes, mostrando el promedio de las bandas y el error estándar. El * indica diferencia estadística significativa entre control y células tratadas con 10 µM de NAC. El ** indica diferencia estadística significativa entre células estimuladas con CHC y células tratadas con con 5 y 10 µM de NAC previo al estímulo con CHC (test de t de Student, $p < 0,05$). CHC=Condensado de humo de cigarrillo, uPA=Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa, NAC=N-acetil-cisteína.

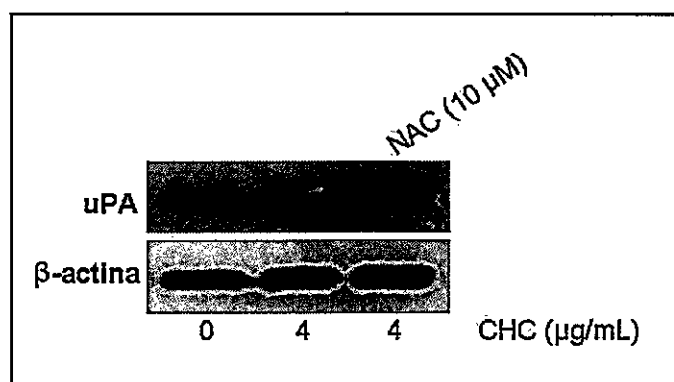


Figura 9.- NAC inhibe la producción de uPA estimulada por CHC en fibroblastos gingivales humanos. Western-blot de medio condicionado concentrado de fibroblastos gingivales estimulados durante 48 horas con 4 $\mu\text{g/mL}$ de CHC en medio libre de suero en presencia de NAC (10 μM). La imagen muestra el aumento en la producción de uPA estimulada por CHC y el efecto inhibitorio de NAC sobre su producción mediada por CHC. Se incluye β -actina como control de carga. CHC=Condensado de humo de cigarrillo, uPA=Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa, NAC=N-acetil-cisteína.

6.5.- CHC estimula la generación de ROS.

Para determinar la capacidad de CHC de producir especies radicales de oxígeno (ROS) intracelular en FG se realizó un ensayo de fluorescencia. FG humanos fueron tratados con DCDHF-DA para luego recibir un estímulo de CHC durante distintos intervalos de tiempo. La generación de ROS fue monitoreada mediante ensayo de fluorescencia del lisado celular con longitudes de onda de 480 nm para excitación y 530 nm para emisión, respectivamente.

El estímulo de FG con CHC (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produjo un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia del lisado celular que va desde los 30 hasta los 60 minutos después de recibido el estímulo ($p < 0,05$, $n=6$), pasado este tiempo se observó un decaimiento en el nivel de fluorescencia hacia las 3 horas luego del estímulo inicial (Figura 10).

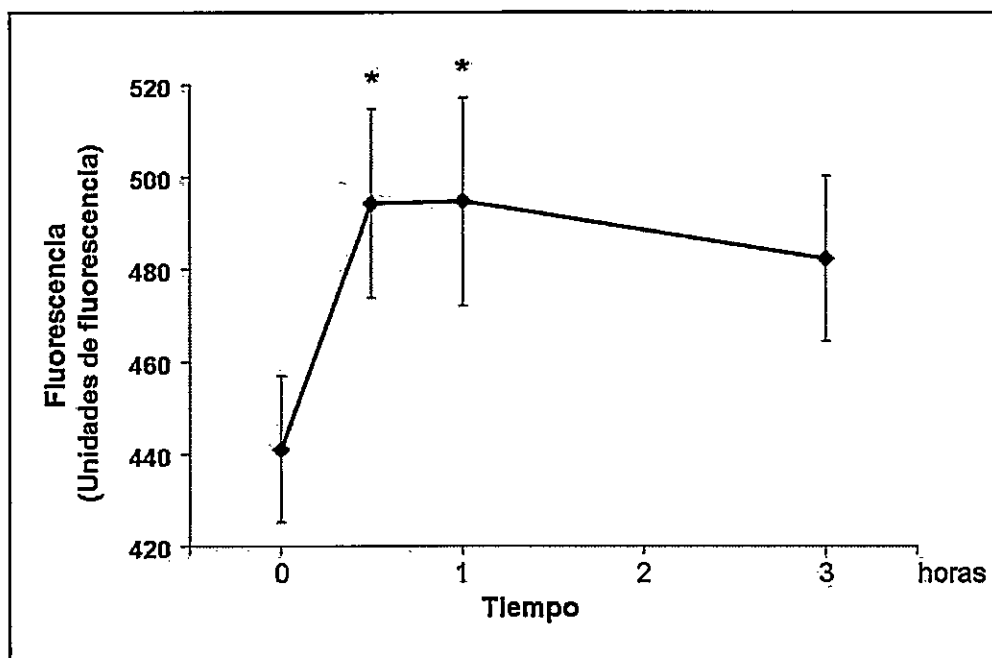


Figura 10.- CHC estimula la generación de ROS, gráfico de fluorescencia vs. tiempo. Ensayo de fluorescencia de lisado celular de fibroblastos gingivales humanos estimulados con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CHC en presencia de DCDHF-DA en medio libre de suero y colorantes por 0, 30, 60 y 180 minutos. El gráfico presenta la emisión de fluorescencia de 6 experimentos independientes mostrando el valor promedio de cada condición experimental y el error estándar. El * indica diferencia estadística significativa entre la emisión de fluorescencia a los 30 y 60 minutos luego del estímulo con CHC, y el control (minuto 0) (test de t de Student, $p < 0,05$).

PARTE IV

DISCUSION

Y

CONCLUSIONES

7.- DISCUSION

En el presente seminario de título se demuestra que el condensado de humo de cigarrillo estimula de manera significativa la producción del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y la conversión de plasminógeno en plasmina en cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos.

Tomando en consideración que la regulación en la producción de uPA es un punto crucial en la remodelación de la matriz extracelular (Vassalli y col., 1991) y que el humo de cigarrillo es considerado un factor de riesgo importante en la progresión de la enfermedad periodontal (Labriola y col., 2005), se analizó el papel que podría cumplir el condensado de humo de cigarrillo en la regulación de la producción y actividad de uPA en fibroblastos gingivales humanos, encontrando una correlación entre la presencia de CHC y la producción de uPA. Los resultados muestran también que este efecto es producido a través de la activación de las vías de transducción de señales ERK1/2 y JNK, moderado por variaciones en el estado redox intracelular en cultivos primarios de FG humanos.

El incremento en la expresión de uPA ha sido asociado a reparación de tejidos alterada (Rogers y col., 1999; Wysocki y col., 1999) y la destrucción del tejido periodontal ha sido atribuida de igual forma a niveles elevados de enzimas degradadoras de la matriz extracelular tales como serina-proteasas y MMPs (Kinnby, 2002; Olofsson y col., 2003; Beklen y col., 2006).

El presente trabajo muestra que CHC puede estimular la producción de uPA en FG humanos, y que este estímulo está asociado a la producción de plasmina activa.

Numerosos estudios han evaluado *in vitro* si la nicotina o el CHC estimulan la producción de enzimas proteolíticas en diferentes tipos celulares. Nicotina estimula la expresión de MMPs en células de músculo liso arterial (Carty y col., 1996) y CHC incrementa los niveles de MMPs en células de endotelio vascular (Nordskog y col., 2003; Wright y col., 2007). En células epiteliales y fibroblastos de pulmón CHC estimula la producción de MMP-1 y MMP-14 (Kim y col., 2004; Ning y col., 2007).

La estimulación de FG con nicotina incrementa la actividad de colagenasa (Tipton & Dabbous., 1995) y la capacidad de estas células para degradar matrices de colágeno (Zhou y col., 2007), lo que sugiere que componentes del cigarrillo podrían estimular la remodelación de la matriz extracelular. Por otro lado, se ha determinado que la generación de plasmina es un potente estímulo para la activación de MMPs (Birkedal-Hansen y col., 1993).

Con estos antecedentes, se puede proponer que la producción de uPA estimulada por CHC puede constituir el primer paso de una señal posteriormente amplificada que, mediante la generación de plasmina, activa una cascada proteolítica que podría explicar la respuesta observada en la remodelación de tejidos en pacientes fumadores.

Estudios previos han determinado que las vías de transducción de señales ERK1/2 y JNK regulan la producción de uPA tanto en cultivos primarios como en

diversas líneas celulares (Parra y col., 2000; Witowsky y col., 2003; Benasciutti y col., 2004). En el caso de FG humanos se ha identificado que la producción de uPA estimulada por EGF y TGF- β 1 es dependiente de las vías de señalización de ERK1/2 y JNK (Smith y col., 2004; Smith & Martínez., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que CHC es capaz de estimular distintas vías de señalización incluyendo: ERK1/2, NF- κ B y EGR-1 en células epiteliales y fibroblastos de pulmón (Hellermann y col., 2002; Becky y col., 2004; Kim y col., 2004).

Es un hecho conocido que la producción de uPA es fuertemente regulada a nivel transcripcional. El promotor de uPA contiene un elemento enhancer AP-1 (Proteína de Activación 1), el cual responde a diversos estímulos extracelulares (Besser y col., 1995). El factor AP-1 es un heterodímero compuesto por el factor de transcripción c-Fos y la proteína c-Jun, cuya activación depende directamente de la vía de JNK, y ambos componentes pueden asociarse para regular la producción de uPA (Aguirre-Guiso y col., 1999).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que bajo el estímulo de CHC, ERK 1/2 y JNK son activadas, y confirman el papel de estas vías de transducción de señales en la producción de uPA. Los experimentos de inhibición con PD98059 y SP600125 sugieren que las vías de JNK y ERK están involucradas en la producción de uPA. En futuros estudios se deberá determinar de manera más precisa el papel específico que tienen estas vías de señalización en la regulación de la producción de uPA en fibroblastos gingivales humanos.

Las especies reactivas de oxígeno intracelulares han sido relacionadas a la producción de uPA en células de carcinoma y en membranas fetales humanas (Kiguchi y col., 2001; Lappas y col., 2003). En fibroblastos gingivales y en células de cáncer gástrico el estímulo con H_2O_2 incrementa la producción de uPA demostrando que ROS está involucrado en la regulación de la producción de uPA en estos tipos celulares (Tanaka y col., 1997; Kim y col., 2005).

ROS actúa como mensajero intracelular en variados procesos tales como: transducción de señales, adhesión celular, expresión de genes, senescencia y apoptosis (D'autreaux & Toledano, 2007). De igual manera, ROS regula la actividad de tirosina-quinasa (PTKs) y de tirosina-fosfatasa (PTPs). La oxidación transiente de grupos sulfhidrilo en PTPs lleva a la inhibición de esas enzimas, mientras que la oxidación del mismo grupo -SH en PTKs produce su activación (Chiarugi, 2005). Por lo tanto, un incremento en la producción de ROS, luego de la estimulación con CHC, podría alterar el equilibrio entre PTKs y PTPs, llevando a la activación de diversas vías de señalización.

Los resultados de este estudio muestran que CHC puede estimular la generación de ROS y la activación de las vías de transducción de señales ERK1/2 y JNK para regular la producción de uPA en FG humanos. Estos hallazgos otorgan una primera aproximación hacia la futura aplicación de compuestos antioxidantes para el control de la respuesta celular del tejido gingival luego de la exposición a derivados del humo de cigarrillo.

8.- CONCLUSIONES

En el presente seminario de título se logró determinar que CHC es capaz de estimular la producción de uPA mediante la generación de ROS y la activación de vías de transducción de señales ERK1/2 y JNK en FG humanos.

Entre los efectos que produce el estímulo de CHC sobre FG humanos se pueden indicar los siguientes:

- En FG humanos, CHC estimula de manera dosis-dependiente la producción de uPA y su actividad proteolítica.
- El aumento en la producción de uPA, producido por CHC, es dependiente de la actividad de ROS intracelular.
- En FG humanos, CHC estimula la generación de plasmina a partir de plasminógeno.
- El incremento en la producción de uPA por CHC es dependiente de las vías de señalización ERK1/2 y JNK.

Los efectos del tabaquismo en tejidos periodontales han sido ampliamente estudiados y atribuidos a diversos mecanismos, pero son escasos los estudios que evalúan el efecto de los componentes del humo de cigarrillo en la expresión, producción y actividad de uPA. En este trabajo se muestra por primera vez que componentes del humo de cigarrillo pueden estimular la actividad y producción de uPA, y que este estímulo es dependiente de la generación de ROS intracelular y de la activación de las vías de señalización ERK1/2 y JNK en fibroblastos gingivales humanos.

9.- BIBLIOGRAFIA

Aguirre-Guiso, J.A. Alonso, D.F. Farias, E.F. Gómez, D.E. deKief Joffè, E.B. 1999. Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur. J. Biochem.* **263**: 295-304.

Ah, M.K. Johnson, G.K. Kaldahi, W.B. Patil, K.D. Kalkwarf, K.L. 1994. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J. Clin. Periodontol.* **21**: 91-97.

Anichini, E. Fibbi, G. Pucci, M. Caldini, R. Chevanne, M. Del Rosso, M. 1994. Production of second messengers following chemotactic and mitogen urokinase-receptor interaction in human fibroblasts and mouse fibroblasts transfected with human urokinase receptor. *Exp. Cell Res.* **213**: 438-448.

Bartold, P.M. Walsh, L.J. Narayanan, A.S. 2000. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol.* 2000 **24**: 28-55.

Becky, A. Mercer, B.A. Kolesnikova, N. Soneto, J. D'Armiento, J. 2004. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J. Biol. Chem.* **279**: 17690-17296.

Beklen, A. Tüter, G. Sorsa, T. Hanemaaijer, R. Virtanen, I. Tervahartiala, T. Konttinen, Y.T. 2006. Gingival Tissue and Crevicular Fluid Co-operation in Adult Periodontitis. *J. Dent. Res.* **85**: 59-63.

Benasciutti, E. Pagès, G. Kenzior, O. Folk, W. Blasi, F. Crippa, M.P. 2004. MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. *Blood* **104**: 256-262.

Benhar, M. Dalyot, I. Engelberg, D. Levitzki, A. 2001. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6913-6926.

Bergström, J. 2003. Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **30**: 107-113.

Besser, D. Presta, M. Nagamine, Y. 1995. Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth and Differ.* **6**: 1009-1017.

Birkedal-Hansen, H. Moore, H. Bodden, M.K. et al. 1993. Matrix metalloproteinases. A review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**: 197-250.

Bugge, T.H. Kombrick, K.W. Flick, M.J. Daugherty, C.C. Danton, M.J. Degen, J.L. 1996. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* **87**: 709-719.

Carmeliet, P. Schoonjans, L. Kieckens, L. et al. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**: 419- 424.

Carty, C.S. Soloway, P.D. Kayastha, S. et al. 1996. Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.* **24**: 927-934.

Chang, Y.C. Huang, F.M. Tai, K.W. Yang, L.C. Chou, M.Y. 2002. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J. Periodont. Res.* **37**: 279-285.

Chiarugi, P. 2005. PTPs versus PTKs: The redox side of the coin. *Free Radic. Res.* **39**: 353-364.

College of Agriculture, R. 2009. The reference cigarette.

Czekay, R-P. Aertgeerts, K. Curriden, S.A. Loskutoff, D.J. 2003. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J. Cell Biol.* **160**: 781-791.

D'Autreaux, B. Toledano, M.B. 2007. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 813-824.

Danø, K. Andreasen, P.A. Grondhal-Hansen, K. Kristensen, P. Nielsen, L.S. Skriver, L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**: 139-266.

Gamal, A.Y. Bayomy, M.M. 2002. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J. Clin. Periodontol.* **29**: 763-770.

Genco, R.J. Kornman, K. Williams, R. Offenbacher, S. 1996. Consensus Report for Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann. Periodontol.* **1**: 926-932.

Giannopoulou, C. Geinoz, A. Cimasoni, G. 1999. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J. Clin. Periodontol.* **26**: 49-55.

Graswinckel, J.E. van der Velden, U. van Winkelhoff, A.J. Hoek, F.J. Loos, B.G. 2004. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J. Clin. Periodontol.* **31**: 562-568.

Grossi, S.G. Zambon, J.J. Ho, A.W. Koch, G. Dunford, R.G. Machtei, E.E. Norderyd, O.M. Genco, R.J. 1994. Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicators for attachment loss. *J. Periodontol.* **65**: 260-267.

Grossi, S.G. Genco, R.J. Machtei, E.E. et al. 1995. Assessment of risk factors for periodontal disease II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J. Periodontol.* **66**: 23-29.

Guntsch, A. Erler, M. Preshaw, P.M. Sigusch, B.W. Klinger, G. Glockmann, E. 2006. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J. Periodont. Res.* **41**: 184-188.

Haber, J. Kent, R.L. Crowley, M. Mandell, R. Joshipura, K. Wattles, J. 1993. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J. Periodontol.* **64**: 16-23.

Hellermann, G.R. Nagy, S.B. Kong, X. Lockey, R.F. Mohapatra, S.S. 2002. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir. Res.* **3**: 22-29.

James, J.A. Sayers, N.M. Drucker, D.B. Hull, P.S. 1999. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontol.* **70**: 518-525.

Johnson, G.K. Guthmiller, J.M. 2007. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol.* 2000 **44**: 178-194.

Johnson, N.W. Griffiths, G.S. Wilton, J.M.A. Maiden, M.F.J. Curtis, M.A. Gillett, I.R. Wilson, D.T. Sterne, J.A. 1988. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Evidence for the existence of high-risk groups and individuals and approaches to their detection. *J. Clin. Periodontol.* **15**: 276-282.

Kiguchi, T. Niiya, K. Shibakura, M. et al. 2001. Induction of urokinase-type plasminogen activator by the anthracycline antibiotic in human RC-K8 lymphoma and H69 lung-carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **93**: 792-797.

Kim, H. Liu, X. Kohyama, T. Kobayashi, T. et al. 2004. Cigarette smoke stimulates MMP-1 production by human lung fibroblasts through the ERK1/2 pathway. *COPD.* **1**: 13-23.

Kim, M.H. Cho, H.S. Jung, M. et al. 2005. Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* **26**: 1669-74.

Kinnby, B. Lindberg, P. Lecander, I. Matsson, L. 1999. Localization of plasminogen activators and plasminogen inhibitors in human gingival tissues demonstrated by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Arch. Oral Biol.* **44**: 1027-1034.

Kinnby B. 2002. The plasminogen activating system in periodontal health and disease. *Biol. Chem.* **383**: 85-92.

Labriola, A. Needleman, I. Moles, D.R. 2005. Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol.* 2000 **37**: 124-137.

Lappas, M. Permezel, M. Rice, G.E. 2003. N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 1723-1729.

Larjava, H. Heino, J. Kähäri, V-M. Vuorio, E. 1989. Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. *J. Dent. Res.* **68**: 20-25.

Linden, G.J. Mullally, B.H. 1994. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J. Periodontol.* **65**: 718-723.

Loskutoff, D.J. Quigley, J.P. 2000. PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix. *J. Clin. Invest.* **106**: 1441-1443.

Lund, L.R. Rømer, J. Bugge, T.H. et al. 1999. Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J.* **18**: 4645-4656.

Martinez-Canut, P. Lorca, A. Magan, R. 1995. Smoking and periodontal disease severity. *J. Clin. Periodontol.* **22**: 743-749.

Martínez, J. Fuentes, M. Cambiazo, V. Santibáñez, J.F. 1999. Bone extracellular matrix stimulates invasiveness of estrogen-responsive human mammary MCF-7 cells. *Int. J. Cancer* **83**: 278-282.

Martins, A.G. Andia, D.C. Sallum, A.W. Sallum, E.A. Casati, M.Z. Nociti, F.H. Jr. 2004. Smoking may affect root coverage outcome: a prospective clinical study in humans. *J. Periodontol.* **75**: 586-591.

Morozumi, T. Kubota, T. Sato, T. Okuda, K. Yoshie, H. 2004. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.* **31**: 267-272.

Ning, W. Dong, Y. Sun, J. Li, C. Matthay, M.A. Feghali-Bostwick, C.A. Choi, A.M. 2007. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**: 480-490.

Nordskog, B.K. Blixt, A.D. Morgan, W.T. Fields, W.R. Hellman, G.M. 2003. Matrix degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc. Toxicol.* **3**: 101-117.

Offenbacher, S. 1996. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann. Periodontol.* **1**: 821-878.

Olofsson, A. Lindberg, P. Lanke, J. Matsson, L. Kinnby, B. 2003. Relationship between fibrinolytic activity and gingival inflammatory reaction in young individuals. *J. Periodontal Res.* **38**: 104-108.

Pabst, M.J. Pabst, K.M. Collier, J.A. et al. 1995. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J. Periodontol.* **66**: 1047-1055.

Parra, M. Lluís, F. Miralles, F. Caelles, C. Muñoz-Cánoves, P. 2000. The cJun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway mediates induction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) by the alkylating agent MNNG. *Blood* **96**: 1415-1424.

Pihlstrom, B.L. Michalowicz, B.S. Johnson, N.W. 2005. Periodontal diseases. *The Lancet* **366 (9499)**: 1809-1820.

Pryor, W.A. 1982. Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **393**: 1-30.

Pryor, W.A. 1984. Free radicals in autoxidation and in aging. Part I. Kinetics of the autoxidation of linoleic acid in SDS micelles: calculations of radical concentrations, kinetic chain lengths, and the effects of vitamin E. Part II. The role of radicals in chronic human diseases and in aging. In: *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease* (D. Armstrong, R. S. Sohal, R. G. Cutler, and T. F. Slater, Eds.), Raven Press, New York. 13-41.

Pryor, W.A. 1985. Free radical involvement in diseases and aging. The toxicity of lipid hydroperoxides and their decomposition products. In: *The Effects of Nutrition on Xenobiotic Metabolism* (J.W. Finley and D. E. Schwass, Eds.), American Chemical Society, Washington, DC. 77-96.

Resnati, M. Guttlinger, M. Valmonica, S. Sidenius, N. Blasi, F. Fazioli, F. 1996. Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemostatic effect. *EMBO J.* **15**: 1572-1582.

Rogers, A.A. Burnett, S. Lindholm, C. et al. 1999. Expression of tissue-type and urokinase-type plasminogen activator activities in chronic venous leg ulcers. *Vasa.* **28**: 101-105.

Ryder, M.I. Fujitaki, R. Johnson, G. Hyun, W. 1998. Alterations of neutrophil oxidative burst by in vitro smoke exposure: implications for oral and systemic diseases. *Ann. Periodontol.* **3**: 76-87.

Santibañez, J.F. Maccioni, R.B. Martínez, J. 1995. The secretion of urokinase-like plasminogen activator is inhibited by microtubule-interacting drugs. *Cell Biochem. Funct.* **13**: 217-225.

Schäfer, B.M. Maier, K. Eickhoff, U. Todd, R.F. Kramer, M.D. 1994. Plasminogen activation in healing human wounds. *Am. J. Pathol.* **144**: 1269-1280.

Schenkein, H.A. Gunsolley, J.C. Koertge, T.E. Schenkein, J.G. Tew, J.G. 1995. Smoking and its effects on early-onset periodontitis. *J. Am. Dent. Assoc.* **126**: 1107-1113.

Shaulin, E. Karim, M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **4**: E131-E136.

Smith, P.C. Santibáñez, J.F. Morales, J.P. Martínez, J. 2004. Epidermal growth factor stimulates urokinase-type plasminogen activator expresión in human gingival fibroblasts. Possible modulation by genistein and curcumin. *J. Periodont. Res.* **39**: 380-387.

Smith, P.C. Martínez, J. 2006. Differential uPA Expression by TGF- β 1 in Gingival Fibroblasts. *J. Dent. Res.* **85**: 150-155.

Soder, B. 1999. Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol. Scand.* **57**: 77-82.

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

Strietzel, F.P. Reichart, P.A. Kale, A. Kulkarni, M. Wegner, B. Kuchler, I. 2007. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* **34**: 523-544.

Tanaka, F. Ogura, N. Abiko, Y. 1997. Stimulation of plasminogen activator/plasmin system in gingival fibroblast cells by oxygen radicals. *Arch. Oral Biol.* **42**: 263-270.

Tanur, E. McQuade, M.J. McPherson, J.C. AlHashimi, I.H. Rivera-Hidalgo, F. 2000. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J. Periodontol.* **71**: 717-722.

Tipton, D.A. Dabbous, M.K. 1995. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.* **66**: 1056-1064.

Tomar, S.L. Asma, S. 2000. Smoking-attributable periodontitis in the United States. Findings from NHANES III. National Health and Nutritional Examination Survey. *J. Periodontol.* **71**: 743-751.

Tomek, R.J. Rimar, S. Eghbali-Webb, M. 1994. Nicotine regulates collagen gene expresión, collagenase activity, and DNA síntesis in cultured cardiac fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* **136**: 97-103.

Torres, M. 2003. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front. Biosci.* **8**: d369-d391.

Vassalli, J.D. Sappino, A.P. Belin, D. 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* **88**: 381-389.

Weckroth, M. Vaheri, A. Myöhänen, H. Tukiainen, E. Sirén, V. 2001. Differential effects of acute and chronic wound fluids on urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and tissue-type plasminogen activator in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *Wound Repair Regen.* **9**: 314-22.

Williams, R.C. 1990. Periodontal disease. *N. Engl. J. Med.* **322**: 373-382.

Witowsky, J. Abell, A. Johnson, N.L. Johnson, G.L. Cuevas, B.D. 2003. MEKK1 is required for inducible urokinase-type plasminogen activator expression. *J. Biol. Chem.* **278**: 5941-5946.

Wright, J.L. Tai, R. Wang, R. Wang, X. Chung, A. 2007. Cigarette smoke upregulates pulmonary vascular matrix metalloproteinases via TNF- α signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**: L125-L133.

Wynder, E.L. Hoffmann, D. 1967. *Tobacco and Tobacco Smoke*. Academic Press, New York.

Wysocki, A.B. Kusakabe, A.O. Chang, S. Tuan, T.L. 1999. Temporal expression of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and gelatinase-B in chronic wound fluid switches from a chronic to acute wound profile with progression to healing. *Wound Repair Regen.* **7**: 154-65.

Xiao, Y. Huika, L.I. Bunn, C. Bartold, P.M. 2001. The expression of plasminogen activator system in a rat model of periodontal wound healing. *J. Periodontol.* **72**: 849-857.

Zhou, J.B. Olson, L. Windsor, J. 2007. Nicotine increases the collagen-degrading ability of human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* **42**: 228-235.