



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE SÍNTESIS Y
DEGRADACIÓN DE MATRIZ DE COLÁGENA EN
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS TRATADOS CON
CICLOSPORINA A.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ANALI CAMPOS ORTEGA

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESORA: M.C. PATRICIA DE LA TORRE DE LA TORRE

MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SECRETARÍA AUXILIAR

DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PRESENTE.

Me permito informarle que la tesis con el título:

Expresión de moléculas de síntesis y degradación de matriz de colágeno en fibroblastos gingivales humanos
tratados con Ciclosporina A.

realizada por Anaí Campos Ortega, con número de cuenta
305322256, fue autorizada para impresión el día 30 del mes de Enero de 20 14
después de recibir los votos aprobatorios de los revisores:

Mtra. Amalia Cruz Chávez

NOMBRE

[Firma]
FIRMA

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

NOMBRE

[Firma]
FIRMA

Mtra. María Teresa Espinosa Meléndez

NOMBRE

Ma. Teresa Espinosa H
FIRMA

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D.F. 06 02 14

EL SECRETARIO AUXILIAR



MTRO. JORGE MARIO PALMA CALERO

Esta tesis titulada “Expresión de moléculas de síntesis y degradación de matriz de colágena en fibroblastos gingivales humanos tratados con ciclosporina A” que presenta la alumna Anali Campos Ortega fue realizada bajo la dirección de tesis de la Dra. Eileen Uribe Querol. El financiamiento para su realización pertenece al proyecto IA202013 cuya responsable es la Dra. Uribe y pertenece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), de la UNAM.

Dedicada a mi madre Francisca Ortega y mi padre Pedro Campos quienes amo ante todo por haberme forjado un camino de valores y perseverancia a lo largo de mi vida. Porque su apoyo, confianza y amor incondicional fueron cruciales para lo que hoy es una meta cumplida, los amo. A mis hermanas Yazmin, Karen y Diana por ser una gran parte de mi vida, y hacer de mis estancia en casa momentos agradables, soy muy feliz de tenerlas a mi lado.

A la Dra. Eileen Uribe quien siempre admirare por ser una excelente persona y docente, le doy gracias haberme dado gusto de conocerla y poder llevarme un gran recuerdo de servicio social y ahora mi tesis, ya que sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A la Dra. Patricia De la Torre, que me ha regalo una gran cantidad de su tiempo, e hizo de mis ratos en laboratorio momentos agradables con sus enseñanzas y paciencia.

A la Facultad de Odontología por haberme permitido conocer a personas maravillosas a través de los años, que hicieron recuerdos tan intrañables y memorables, difícil de olvidar. Cada uno de mis amigos me ha dejado sonrisas, lecciones de vida.

ÍNDICE

1. Resumen	6
2. Introducción	
2.1. Agrandamiento gingival	7
2.2. Clasificaciones del agrandamiento gingival(AG)	7
2.3. Agrandamiento gingival inducido por fármacos	10
2.4. Ciclosporina A (CsA)	11
2.5. Efectos adversos de la Ciclosporina A	13
2.6. Síntesis de colágena	15
2.7. Degradación y regulación de la degradación de la colágena	17
2.8. Metaloproteasas (MMP)	19
2.9. Inhibidores de metaloproteasas (TIMP)	23
2.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
2.11. Retrotranscripción - Reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR	27
2.12. Parámetros importantes del RT-PCR	29
3. Antecedentes	
3.1. Cambios de las moléculas de MMP y TIMP	30
4. Planteamiento del problema	31
5. Justificación del problema	32
6. Hipótesis	32
7. Objetivo	32
8. Materiales y métodos	
8.1. Líneas celulares	33
8.2. Descongelación de líneas celulares	33
8.3. Cultivo celular	34
8.4. Extracción de RNA por técnica de trizol	34
8.5. Cuantificación de RNA	36

8.6. Nanodrop 2000c	37
8.7. Integridad del RNA	38
8.8. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	38
9. Resultados	42
10. Discusión	44
11. Conclusión	46
12. Bibliografía	47

1. RESUMEN

El agrandamiento gingival genera alteraciones estéticas y problemas periodontales en los pacientes que lo presentan. Un alto porcentaje de pacientes medicados con Ciclosporina A sufren de agrandamiento gingival. Es muy probable que este padecimiento promueva la acumulación de placa dentobacteriana. Así, el fármaco y la placa producen una inflamación crónica, pérdida dental, y dificultad para hablar. Estos eventos conllevan a un incremento en la susceptibilidad a infecciones, caries y enfermedad periodontal. La única forma de tratar el agrandamiento gingival causado por fármacos, sobre todo cuando es un tratamiento de por vida, es la cirugía periodontal.

Con el propósito de entender mejor los mecanismos celulares que subyacen al agrandamiento gingival provocado por tratamientos crónicos de Ciclosporina A, en el presente trabajo se analizaron algunos aspectos de la síntesis y degradación de la colágena en pacientes tratados con Ciclosporina A. En específico, se realizó la comparación de la expresión de la colágena tipo I, metaloproteasa tipo I y del inhibidor de la metaloproteasa tipo I, entre una línea de fibroblastos gingivales derivada de un paciente con agrandamiento gingival inducido por un fármaco inmunosupresor, Ciclosporina A y una línea de fibroblastos gingivales derivados de un individuo sano.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Agrandamiento Gingival

El agrandamiento gingival (AG) es un crecimiento indoloro y exacerbado de la encía, comienza en la encía papilar (*Figura 1*), continúa creciendo de forma circular y conforme progresa, se extiende al margen gingival de la encía provocando que cubra una porción considerable de las coronas dentales (*Figura 2*).⁽¹⁾

Histopatológicamente, el AG es caracterizado por engrosamiento del epitelio y tejido conjuntivo gingival, mayor cantidad de fibroblastos, acumulación de matriz extracelular, y aumento de las fibras de colágeno tipo I y III.⁽²⁾ Sin embargo, no todos los tipos de agrandamiento contienen todos estos elementos, ni en las mismas proporciones. Además, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares de cada tipo de AG.⁽²⁾



Figura 1. Encía sana. Se pueden observar los diferentes tipos de encía (insertada, marginal y papilar) y la mucosa.

2.2 Clasificaciones del Agrandamiento Gingival

La Academia Americana de Periodontología en el año 1999, clasificó a las enfermedades gingivales en: inducidas por placa y no inducidas por *placa* (*Tabla 1*). Dentro de las enfermedades gingivales no inducidas por placa se encuentra el AG.⁽¹⁾

Tabla 1. Clasificación del agrandamiento gingival por etiología y cambios fisiológicos ⁽¹⁾

I. Agrandamiento inflamatorio
A. Crónico
B. Agudo
II. Agrandamiento inducido por fármacos
A. Anticonvulsivos.
B. Bloqueadores de Calcio.
C. Inmunosupresores.
III. Agrandamientos relacionados con enfermedades o padecimientos sistémicos
1. Agrandamiento condicionado
A. Embarazo
B. Pubertad
C. Deficiencia de vitamina C
D. Gingivitis de célula plasmática
E. Agrandamiento condicionado no específico (granuloma piógeno)
2. Enfermedades sistémicas que provocan agrandamiento gingival
A. Leucemia
B. Enfermedades granulomatosas (p. ej., granulomatosis de Wegener, sarcoidosis)
IV. Agrandamiento neoplásico (tumores gingivales)
A. Tumores benignos
B. Tumores malignos
V. Agrandamiento idiopático

Para poder estimar el grado de AG se estableció un índice de valoración, en éste, se reconocen tres tipos de agrandamiento, además del grado cero, que

corresponde a una encía normal (*Figura 2 y Tabla 2*). También se ha clasificado de acuerdo a su ubicación y distribución (*Tabla 3*).

Tabla 2. Clasificación del agrandamiento gingival por valoración ^(1, 3)

Grado 0	No hay signos de agrandamiento gingival.
Grado I	El agrandamiento se confina a las papilas interdentes.
Grado II	El agrandamiento afecta las papilas interdentes y la encía marginal.
Grado III	El agrandamiento cubre tres cuartas partes o más de la corona dental.

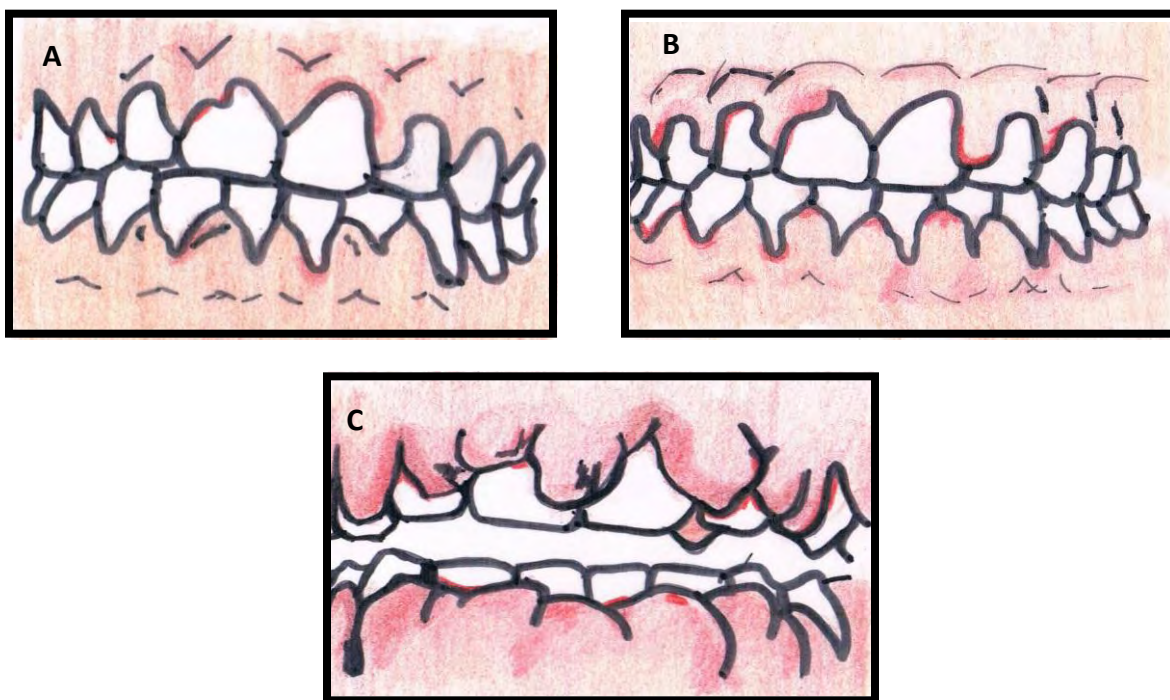


Figura 2. Índice de valoración del agrandamiento gingival.

A) Grado I, B) Grado II y C) Grado III. (Modificado de 33)

Tabla 3. Clasificación del agrandamiento gingival de acuerdo a su ubicación y distribución^(1, 3)

Localizado	Limitado a la encía adyacente de un solo diente o un grupo de dientes.
Generalizado	Afecta la encía de toda la boca.
Marginal	Se confina a la encía marginal.
Papilar	Se confina a la papila interdental.
Difuso	Afecta a las papilas interdenciales, encía marginal e insertada.
Discreto	Un agrandamiento aislado sésil o pedunculado tipo tumor.

2.3 Agrandamiento gingival inducido por fármacos

El AG inducido por fármacos es un efecto secundario no deseado que se produce por la ingesta prolongada de fármacos.⁽⁴⁾ Algunos de los fármacos que lo producen son los anticonvulsivos (Fenitoína), los inmunosupresores (Ciclosporina A) y los bloqueadores de canales de calcio (Nifedipino).^(3, 5)

En un estudio en Irak, 200 pacientes con trasplante renal recibieron Ciclosporina A (CsA) durante al menos 12 meses previos al estudio, para completar su régimen inmunosupresor. De los 200 pacientes, 132 pacientes recibieron además prednisona y micofenolato mofetilo, de los cuales 48 pacientes presentaron AG, y de 68 pacientes que recibieron solo azitrioprina y prednisona; 22 pacientes presentaron AG. De los 200 pacientes, 103 tomaron antihipertensivos (enalapril, diltiazem, nifedipino), 20 de los pacientes que tomaron enalapril, 6 presentaron AG; 58 de los pacientes que tomaron diltiazem, 29 presentaron AG; y de los 25 pacientes que tomaron nifedipino, 11 presentaron AG. De los 97 pacientes restantes que no tomaron antihipertensivos 24 desarrollaron AG.⁽³⁾ Los fármacos

prescritos a los pacientes y aquellos que desarrollaron agrandamiento gingival se muestran en la *tabla 4*.⁽³⁾

Tabla 4. Estudio realizado en una población de 200 pacientes.⁽³⁾

Fármacos administrados	Número de pacientes tratados con fármacos	Pacientes que presentaron AG
CsA, micofenolato mofetilo y prednisona	132	48
CsA, azitrioprina y prednisona	68	22
CsA, micofenolato mofetilo / azitrioprina, y prednisona más enalapril	20	6
CsA, micofenolato mofetilo / azitrioprina, y prednisona más dilitiazem	58	29
CsA, micofenolato mofetilo / azitrioprina, y prednisona más nifedipino	25	11

Dentro de las características clínicas comunes de los AG inducidos por fármacos se presenta una tendencia a encontrarse en el sector anterior de la encía superior e inferior, con mayor prevalencia en pacientes jóvenes y aparición dentro de los 3 meses siguientes al uso del fármaco.⁽⁶⁾

2.4 Ciclosporina A (CsA)

Los efectos inmunosupresores de la CsA fueron descubiertos por J.F. Borel en 1976, quien trabajaba con *Tolypocladium inflatum*, hongo del cual se purificó el fármaco. Fue hasta 1983 que la CsA fue aprobada para su uso clínico como un

potente inmunosupresor. La tasa de éxito de los trasplantes renales fue mejorando con la introducción del fármaco. A su vez, en ese mismo año, fueron descritas las características clínicas del AG que se generaba como efecto secundario al tratamiento.^(7, 8)

La CsA es un polipéptido cíclico de 11 aminoácidos (Figura 3).⁽⁹⁾ Su vía de administración es oral y alcanza su máxima concentración plasmática en 3-4 horas, posee una vida media plasmática de 24 horas.⁽¹⁰⁾

El metabolismo de la CsA tiene lugar en el hígado y la mayoría de los metabolitos que se generan, se excretan en la bilis. Se acumula en la mayoría de los tejidos en concentraciones de tres a cuatro veces mayores a las que se observan en el plasma. Parte del fármaco permanece en el tejido linfomieloideo y en depósitos grasos después de haberse interrumpido su administración.⁽¹¹⁾

La actividad de la CsA como agente inmunosupresor es óptima en un intervalo estrecho de concentraciones, lo que implica que su infradosificación conlleve a un mayor riesgo de rechazo del órgano trasplantado y su sobredosificación a efectos secundarios.⁽⁹⁾

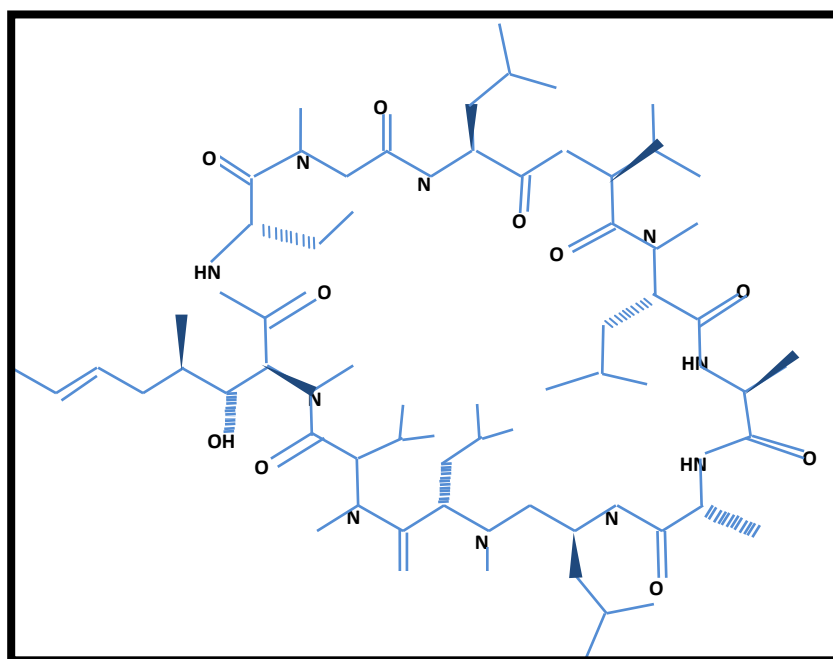


Figura 3. Estructura química de la Ciclosporina A

Normalmente, la interacción de un antígeno con un receptor de un linfocito T ayudador provoca un aumento del Ca^{2+} intercelular. El Ca^{2+} junto con la calmodulina estimula la calcineurina (fosfatasa de serina y treonina), que activa diversos factores de transcripción y promueve la transcripción del gen de interleucina-2 (IL-2).^(11, 12) La CsA inhibe a la calcineurina, dependiente de la calmodulina. Esta inhibición promueve la disminución en la producción de IL-2 y con ello, se reduce la proliferación de los linfocitos T.⁽⁹⁾ En específico, se disminuye la inducción y proliferación clonal de linfocitos T citotóxicos a partir de linfocitos T precursores CD8^+ .⁽¹¹⁾ Además, se reduce la respuesta de linfocitos B dependientes de linfocitos T.⁽¹¹⁾

2.5 Efectos adversos de la Ciclosporina A

El uso clínico de CsA se asocia con una serie de efectos secundarios graves que incluyen nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad e hipertensión arterial,^(1, 13) Además de estos efectos se ha reportado el agrandamiento gingival (*Figura 4*) con aumento en la proliferación de fibroblastos⁽⁴⁾, anorexia, letargo, temblor, parestesia y trastornos digestivos.⁽¹¹⁾ Este fármaco puede interferir con las funciones orales normales, causando retraso en la erupción dental, dificultad para hablar, problemas de higiene oral, problemas estéticos y ocasionar un impacto psicológico. Sus efectos secundarios varían en función de la predisposición genética del paciente, duración del tratamiento, dosis, concentración en saliva, higiene bucal y edad.^(13, 14)



Figura 4. Agrandamiento gingival inducido por CsA.

El AG inducido por CsA también promueve un crecimiento indoloro de vestibular a lingual. La zona anterior superior e inferior son las más afectadas, con un aumento significativo en la mucosa bucal, disminución de densidad ósea y aumento de osteoclastos⁽³⁾, suele aparecer dentro de los tres meses de medicación, su progreso puede ser localizado o generalizado, y de moderado a severo.⁽¹⁵⁾ Algunos de los factores que impactan el proceso de agrandamiento pueden ser de origen genético. Además del control de placa dentobacteriana, inflamación, dosis, duración de la administración fármaco, concentración de CsA en sangre y edad del paciente.⁽²⁾

Se ha reportado que la prevalencia de AG inducido por CsA es de un 30% en niños con una ingesta de más de 500 mg/día.⁽³⁾

Existen diversas hipótesis para explicar por qué la CsA compromete la encía, pero la más aceptada es que su principal metabolito, la hidroxyciclosporina (M17) estimula la proliferación de los fibroblastos que causa la acumulación excesiva de matriz extracelular.^(6, 10)

El AG tiene los mismos signos clínicos que el edema local. Estudios ultraestructurales muestran que el aumento en las dimensiones de la encía se debe principalmente a la sobreproducción de proteoglicanos y glicosaminoglicanos, llevada a cabo por los fibroblastos.⁽²⁾

El AG producido como respuesta ante el tratamiento con CsA puede ser generado por la alteración de homeostasis en la síntesis y degradación de colágena de cada individuo. Se caracteriza por acumulación de matriz extracelular (ECM) en el tejido conectivo de la encía, con diversos grados de inflamación crónica que puede ser causada por la producción de citoquinas inflamatorias como la interleucina 1- β que se sabe estimula la proliferación de fibroblastos gingivales e influencia el metabolismo de fibroblastos.⁽¹⁶⁾ A pesar de estos antecedentes aún no son claros los mecanismos precisos que generan el AG.

2.6 Síntesis de Colágena

Los fibroblastos y miofibroblastos son las células responsables de la producción de colágena y ECM. En presencia de un agente estimulante y medio favorable se llega a producir un incremento en transcripción de mRNA de colágena que es rico en prolina, glicina, y enlaces disulfuro que forman instantáneamente una triple hélice de colágena madura sintetizada en el retículo endoplásmico y en el aparato de golgi. Las fibras de colágena son unidas por moléculas de fibronectina, proteoglicanos y el factor de von Willebrand para formar la ECM.⁽¹⁷⁾ La prolina estabiliza la conformación de cada hélice α y la glicina se encuentra cada tres aminoácidos a lo largo de la región central de la cadena α . La glicina también favorece la unión de las tres cadenas α .⁽¹⁸⁾ Las moléculas de colágena tienen tres cadenas α que forman una triple hélice fibrilar^(17, 18), estas fibrillas influyen en las funciones celulares a través de la interacción con integrinas.⁽¹⁷⁾

Cinco tipos de colágena (I, II, III, V y XI) constituyen las fibrillas de colágena una vez secretadas al espacio extracelular. Estas son estructuras delgadas de 10 nm y 300 nm de diámetro, al unirse forman haces de fibra de colágena.⁽¹⁸⁾

Cada cadena polipéptica de colágena es sintetizada por ribosomas unidos a la membrana y translocada al lumen del retículo endoplásmico en forma de procadenas α . Las procadenas α tienen un péptido señal, en la región amino terminal, necesario para transportar al polipéptido a través de la membrana del retículo endoplasmático y también presentan aminoácidos adicionales (propéptidos), situados en las regiones amino y carboxilo terminales. En la luz del retículo endoplasmático determinados residuos de prolina y lisina son hidroxilados, dando lugar a hidroxiprolinas e hidroxilisinas, algunas de ellas, a su vez, son glucosiladas. Cada procadena α se combina con otras dos mediante enlaces de hidrógeno, formando la molécula helicoidal trimérica procolágena (*Figura 5*).⁽¹⁸⁾

La hidroxilisina e hidroxiprolina forman en la colágena enlaces de hidrógeno intercatenarios de manera que estabilizan la triple hélice, estos residuos no se encuentran en otras proteínas. Los propéptidos de procolágena fibrilar son

excretados y su degradación se realiza mediante proteasas específicas extracelulares, formando así fibras de colágena. Estos propéptidos dirigen la formación intracelular trímica de colágena e impiden la formación de fibras de colágena intracelular.⁽¹⁸⁾ La fibra de colágena es levógira espaciada cada 67 nm debido a la adhesión de fibrillas de colágena, y fortalecida por enlaces covalentes, que al romperse desestabilizan las fibras de colágena (*Figura 5*).^(18, 19)

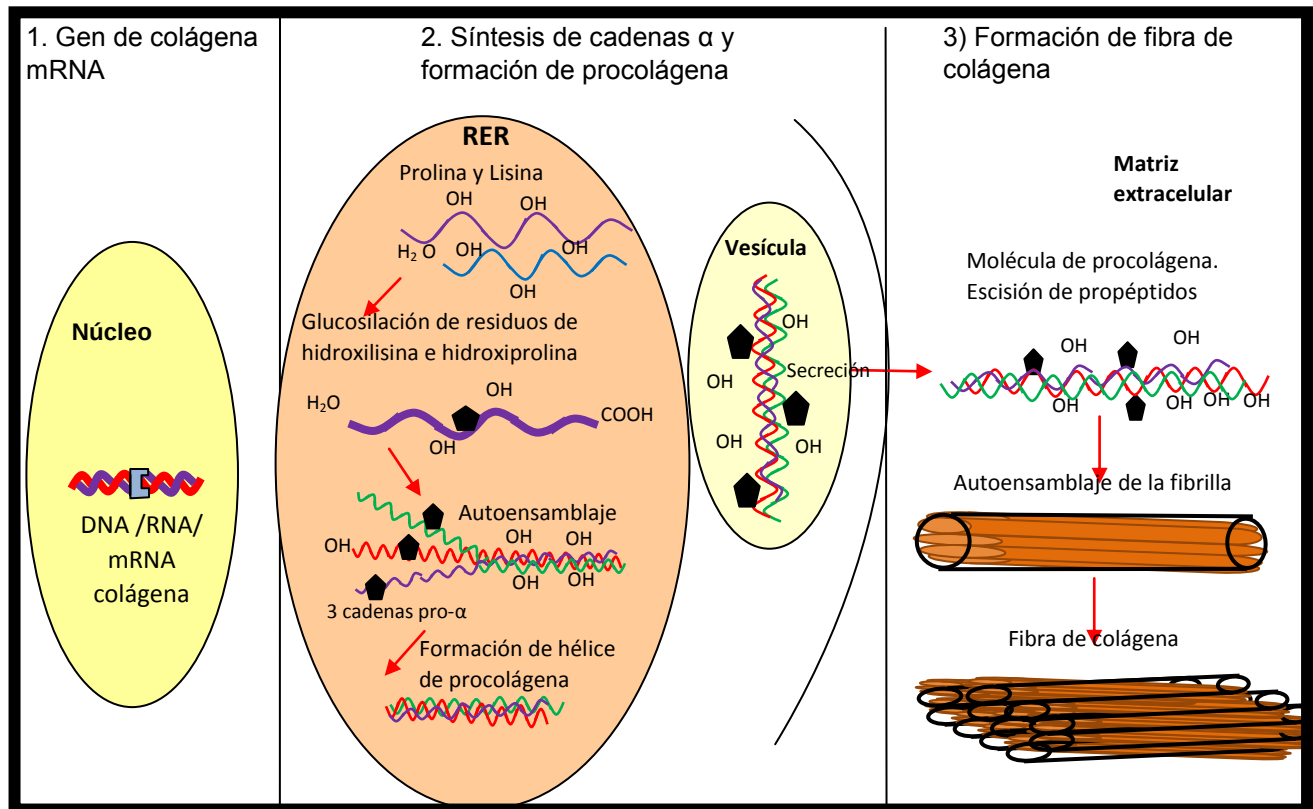


Figura 5. 1) Formación de mRNA para cadena alfa de precolágena. 2) Síntesis de cadenas alfa de procolágena con extrapolipéptidos terminales. Hidroxilación de residuos de prolina y lisina. Se unen moléculas de glucosa y galactosa. Autoensamblaje de las cadenas de precolágena formando una cadena de procolágena. Formación de vesículas secretoras de procolágena adicionadas con hidratos de carbono. 3) Liberación de procolágena a la matriz extracelular. Los extrapolipéptidos terminales son removidos por procolágena peptidasas, transformando la procolágena en tropocolágeno. Las moléculas de tropocolágena se autoensamblan para formar fibras de colágena.

modificado de (18)

El metabolismo de la colágena se encuentra equilibrado por la síntesis y degradación de la misma, que mantiene el volumen del tejido. En general, la fibrosis es causada por la pérdida de esta homeostasis, lo que resulta en la acumulación excesiva de fibras de colágena.⁽¹⁶⁾

Las enzimas responsables de la degradación de la matriz son las metaloproteasas y la proteasa lisosomal de cisteína (catepsina B y L) que se considera importante para la digestión adicional de componentes de la ECM. Los inhibidores de las metaloproteasas se denominan TIMPs.⁽²⁰⁾

Recientemente se ha demostrado una reducción en la producción de metaloproteasa tipo I (MMP-1) y del inhibidor de metaloproteasa tipo I (TIMP-1) en tejido con AG inducido por CsA en comparación de una encía normal. Los mecanismos por los que estos fármacos inhiben la expresión de las enzimas que degradan la ECM no se conoce todavía. Sin embargo, se ha visto que la CsA suprime los niveles intracelulares de Ca^{2+} .⁽²⁰⁾

2.7 Degradación y regulación de la degradación de la colágena

La ECM es el soporte estructural, de señalización celular y de respuesta a factores de crecimiento al que se expone la célula. La composición de la matriz depende del equilibrio entre activación e inhibición de las metaloproteasas (MMPs)⁽²¹⁾ sometiendo a un continuo recambio de las macromoléculas (colágena) degradadas o sintetizadas. Los componentes de la matriz son degradados por enzimas proteolíticas (proteasas) secretadas localmente en las células.⁽¹⁸⁾

La colágena recién sintetizada puede ser degradada antes de ser secretada por las células o antes de ser incorporada en las fibrillas de la ECM (*Figura 6*). Hay evidencia que sugiere que en el envejecimiento celular existe un aumento en la degradación de colágena recién sintetizada.⁽¹⁷⁾

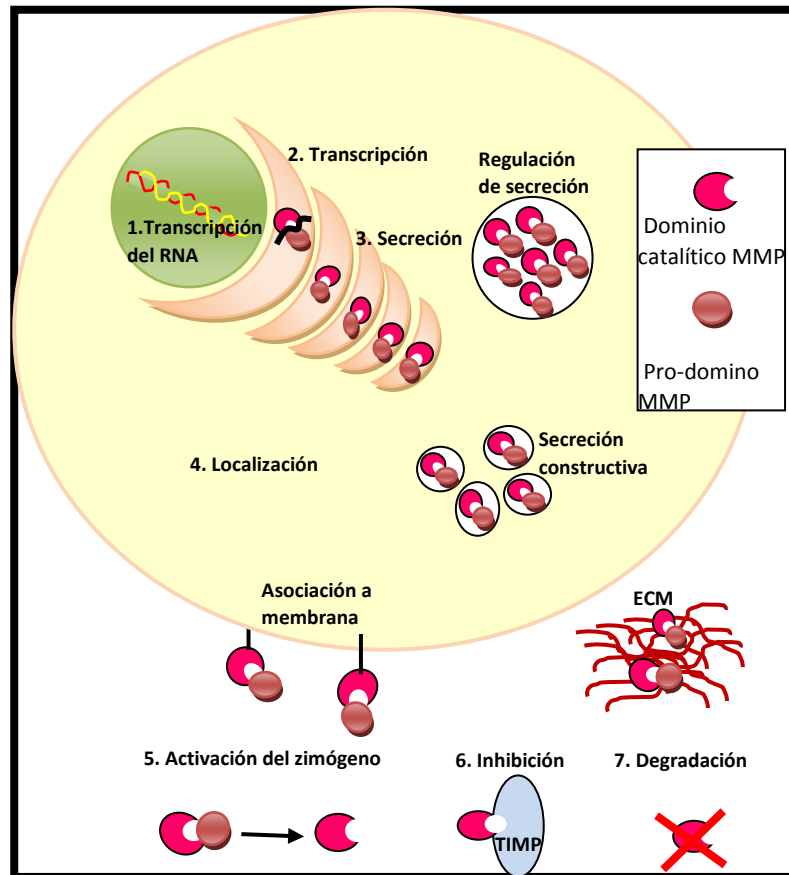


Figura 6. Regulación de MMP. 1) Transcripción de RNA. 2) Síntesis de proteínas, la función de MMP puede ser regulada en 3) Secreción intracelular. 4) Localización subcelular o extracelular, 5) Activación de la forma zimógeno. 6) Inhibidores de la expresión de sus proteínas endógenas (TIMP) 7) Degradación de proteasa. ^{modificado de (22)}

Las collagenasas son específicas para diversos tipos de colágena. Requieren de Zn^{2+} y Ca^{2+} para su actividad. Estas enzimas están involucradas en la remodelación del tejido conectivo durante el crecimiento y la reparación de heridas. La degradación descontrolada del tejido conectivo se observa en tumores y algunas enfermedades como la artritis, debido a esto, las proteasas responsables de estos procesos son blanco para el diseño de inhibidores con fines terapéuticos. La collagenasa activa presenta dos dominios; uno interviene en el reconocimiento del sustrato y el otro contiene metales y aminoácidos que participan en la reacción. ⁽²³⁾

2.8 Metaloproteasas (MMP)

La ECM presenta una gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grupos: proteoglicanos y glicosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágena y elastina) y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Todas las proteínas se encuentran en correlación y necesitan de una familia de proteasas para degradar los componentes de la matriz.⁽²⁰⁾ En 1962 Gross y Lapiere encontró en una cola de renacuajo una enzima que podía degradar la colágena fibrilar, la MMP-1.^(22, 24)

Las MMPs son proteínas dependientes de zinc.⁽²¹⁾ Las células del tejido conectivo como fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos secretan MMPs.⁽²⁵⁾ Su actividad catalítica de proteínas de membrana y proteínas secretoras se debe al anclaje o secreción a la superficie celular.⁽²⁴⁾ Existen 25 MMPs clasificadas en cinco subfamilias de acuerdo a la especificidad con el sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, metaloproteasas de membrana y matrilisinas (*Tabla 5*).^(21, 24)

Enzimas específicas de esta familia actúan en la degradación de moléculas de colágena.^(21, 24, 26) Además de encontrarse presentes en procesos de remodelación de tejidos y dentina, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, metástasis del cáncer, y enfermedades periodontales.⁽²⁵⁾

La estructura básica de las MMP se compone de tres dominios: N-terminal o predominio (Pre o dominio catalítico), propéptido o prodominio (pro o dominio inhibidor) de 80 aminoácidos y un residuo hidrofóbico en el amino terminal, contiene una secuencia de PRCXXPD (pro-arg-cys-x-x-pro-asp), donde X denota cualquier aminoácido (*Figura 7*). El grupo tiol del residuo de cisteína se encuentra ligado con el ión zinc al predominio de la MMP (mantiene la enzima latente hasta eliminarse por proteólisis). El predominio con un ión zinc de 160-170 aminoácidos, contiene una secuencia de HEXXHXXGXXH, que incluye un residuo de ácido glutámico (E) que proporciona el nucleófilo que corta enlaces peptídicos y residuos de histidina que coordinan al ión de zinc^(23, 24) (indica la especificidad del sitio de ruptura al sustrato) y un dominio hemopexina conectado al dominio catalítico por

una bisagra o región de unión H (ejerce influencia en la unión al TIMP, sustratos y actividades proteolíticas).^(22, 23, 26) Los dominios de hemopexina unen colágena permitiendo el acceso al dominio catalizador para el sitio de escisión apropiado. La desnaturalización de los fragmentos de colágena fibrilar se lleva a 37 ° C, y sigue siendo degradada por gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), catepsina K , y cisteínas de proteasa lisosomal presentes en ECM. La catepsina K fragmenta la colágena tipo I y II en los extremos de molécula y en múltiples sitios dentro de la triple hélice.⁽¹⁷⁾

Las MMP son sintetizadas como zimógenos inactivos por una interacción entre un grupo sulfhidrilo y el dominio propéptido. La activación de la MMP se realiza fuera de la superficie celular mediante la unión de integrinas CD4 o por la interacción de proteoglicanos de heparin sulfato al eliminar el dominio propéptido o unirse a TIMPs,^(21, 26) proceso conocido como mecanismo interruptor de la cisteína. Su actividad catalítica es regulada por: la expresión de genes, compartición (acumulación pericelular de enzimas), pro-enzima (o zimógeno) y afinidad por el sustrato. Las citocinas, quimiocinas, receptores y péptidos antimicrobianos aumentan la actividad de las MMP.⁽²⁴⁾

La MMP-1 puede cortar la cadena original en fragmentos de $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$, estos fragmentos tienen menor resistencia que la colágena intacta, por lo cual pueden ser desnaturalizados y degradados por otras metaloproteasas como la MMP-2. Esta última tiene una acción de gelatinasa, es decir, que degrada la colágena desnaturalizada.⁽¹⁵⁾

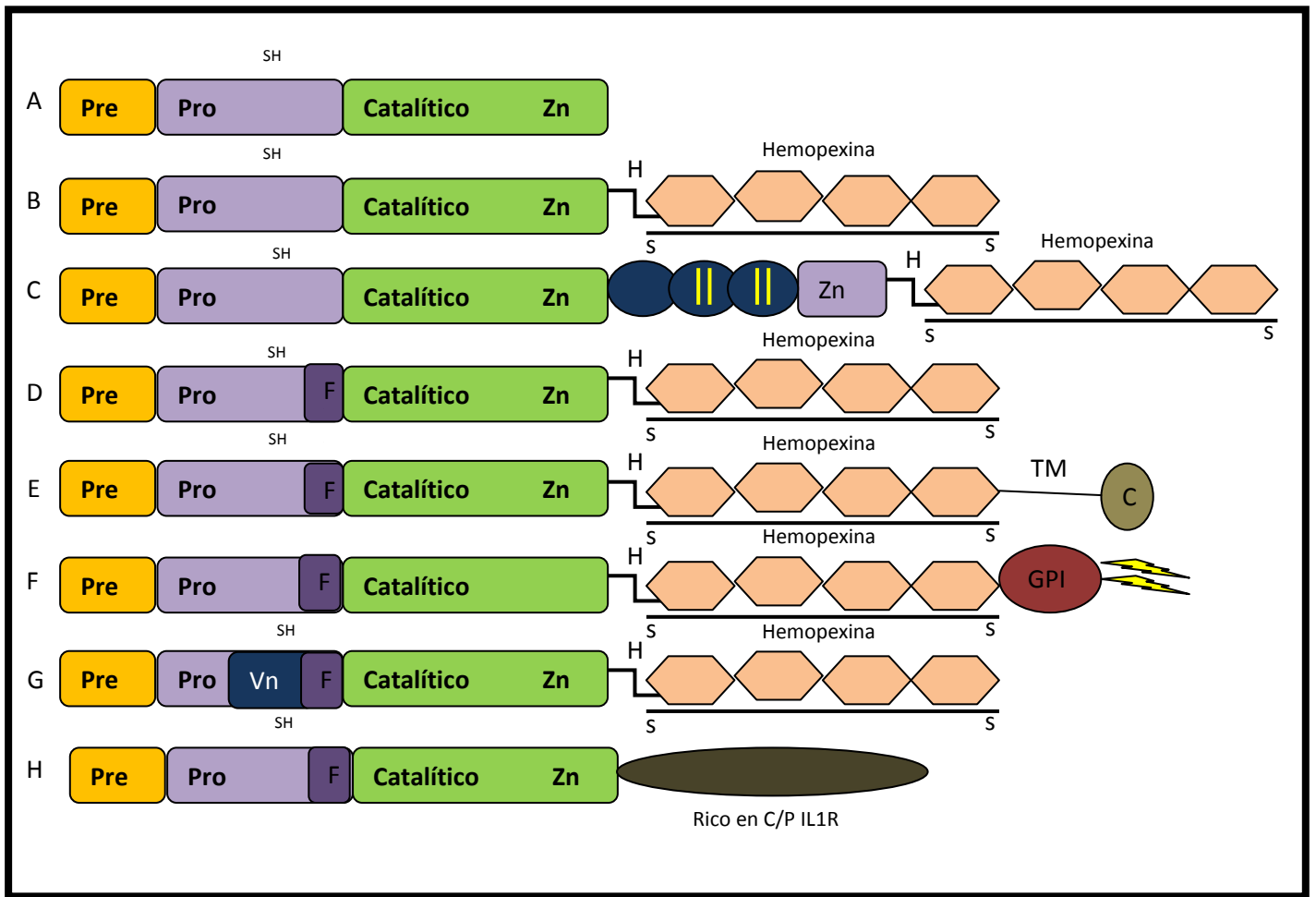


Figura 7.A) Dominios mínimos de la MMP. B) MMP1, MMP8, MMP13, MMP18, MMP3, MMP10, MMP24; F) MMP17, MMP25; G) MMP21; H) HMPP23^{modificado de (21)}

TABLA 5. FAMILIA DE METALOPROTEASAS ⁽²⁶⁾

MMP	Clase estructural	Nombre común
MMP-1	Dominio simple de hemopexina	Colagenasa 1; colágena intersticial, Colágena de fibroblasto
MMP-2	Gelatinasa vinculante	Gelatinasa A; Gelatinasa 72 kDa; Colagenasa tipo IV 72 kDa; Gelatinasa de neutrófilos
MMP-3	Dominio simple de hemopexina	Estromelisina-1; Procolagenasa inactiva
MMP-7	Mínimo dominio	Matrilisina; PUMP1
MMP-8	Dominio simple de hemopexina	Colagenasa 2; Colagenasa de neutrófilo
MMP-9	Gelatinasa vinculante	Gelatinasa 8; Gelatinasa 92 kDa; Colagenasa tipo IV 92 kDa
MMP-10	Dominio simple de hemopexina	Estromelisina 2
MMP 11	Activación y secreción de Furina	Estromelisina 3
MMP-12	Dominio simple de hemopexina	Metaloproteinasa de macrófago
MMP-13	Dominio simple de hemopexina	Colagenasa 3
MMP-14	Transmembrana	MT1-MMP; MTMMP1
MMP-15	Transmembrana	MT2-MMP; MT-MMP2
MMP-16	Transmembrana	MT3-MMP; MTMMP3
MMP17	Ligado GPI	MT4-MMP; MT-MMP4
MMP-18	Dominio simple de hemopexina	Colagenasa 4
MMP-19	Dominio simple de hemopexina	RASI-1, MMP-18
MMP-20	Dominio simple de hemopexina	Enamelisina
MMP-21	Inserto parecido a la vitronectina	Homólogo de Xenopus XMMP6
MMP-22	Dominio simple de hemopexina	CMMP
MMP-23	Transmembrana tipo 1	MMP-21; MMP-22
MMP-24	Transmembrana	MT5-MMP;MT-MMP5
MMP-25	Ligado GPI	MT6-MMP;MT-MMP6
MMP-26	Dominio mínimo	
MMP-27	Dominio simple de hemopexina	Endometasa
MMP-28	Activación y secreción de Furina	Efilisina

2.9 Inhibidores de metaloproteasas (TIMP)

La actividad de las MMP se bloquea por inhibidores generales como la macroglobulina α_2 , TIMP, inhibidores sintéticos de MMP. ⁽²¹⁾ También se inhiben con moléculas menos específicas como las netrininas, procolágena C-terminal, proteinasa potenciados (PCPE), inhibidor de la vía (TFPI-2) y trombospondina-1 o 2. ⁽²⁷⁾

Los TIMPs son una familia de cuatro moléculas muy similares que se diferencian en la expresión y capacidad de inhibir a los tejidos específicos de MMPs que bloquean o revierten la progresión de la enfermedad mediante la unión a su sitio catalizador (sitio de la enzima activa) y al dominio de hemopexina (TIMP-1) que incluyen fragmentos, de carboxi-terminal de la procolágena C-terminal. ^(24, 26, 27) Se encuentran ancladas en la ECM o secretados en la superficie extracelular (*Figura 8 y Figura 9*). ^(21, 27)

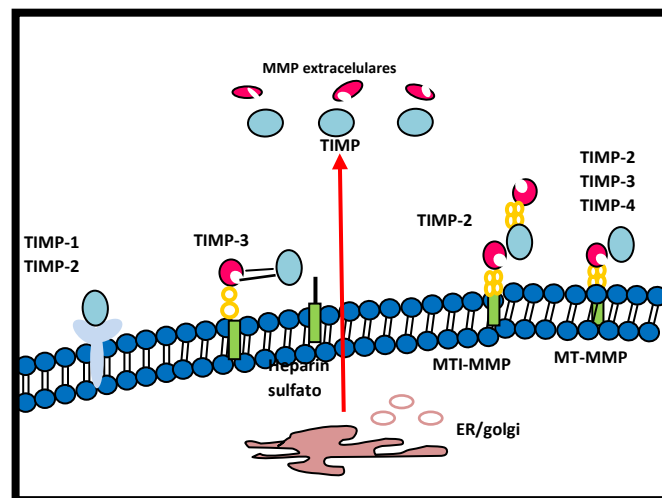


Figura8. Sitios de acción de TIMP modificado de(27)

La familia de proteínas TIMP está compuesta por TIMP- 1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 de 22-28 kDa dependiendo del grado de glicosilación. Los cuatro TIMP actúan como reguladores de la actividad de las MMP. Los TIMPs comprenden dos dominios distintos que se estabilizan por cada tres enlaces disulfuro: un dominio

N-terminal de aproximadamente 125 aminoácidos y un dominio C-terminal de aproximadamente 65 residuos, ambos dominios tienen la capacidad de funcionar de forma independiente; el dominio N-terminal es plenamente activo como inhibidor de las MMP, y el dominio C-terminal es importante en la formación de complejos con pro -enzimas (proMMPs). Los rasgos característicos se encuentran en la *tabla 6*.⁽²⁸⁾

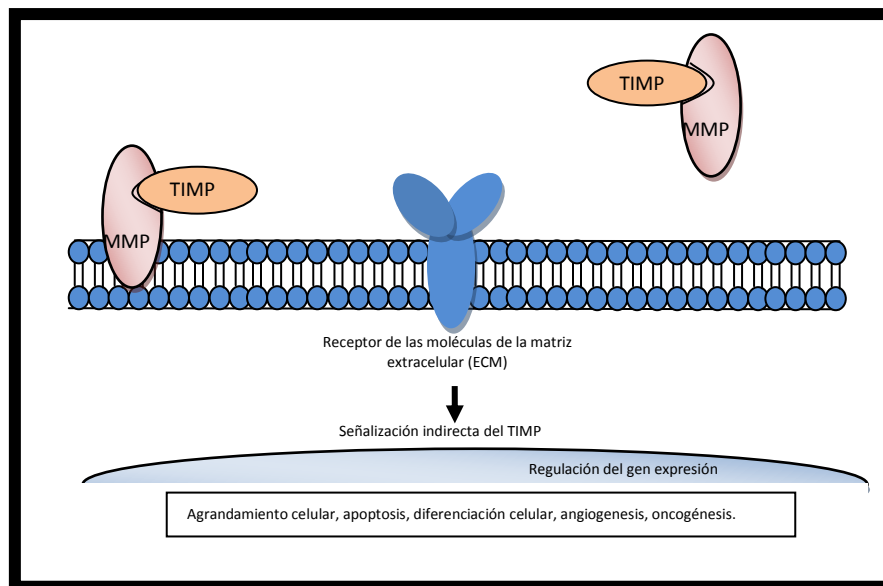


Figura 9. Las MMP son inactivadas. ^{modificado de (28)}

Las moléculas de TIMP actúan en diversos procesos como un modulador de citoquinas en el crecimiento celular, apoptosis, diferenciación celular, angiogénesis y oncogénesis. En las actividades de las MMP que incluyen colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas actúan como inhibidores de su función.⁽²⁸⁾

TIMP-1 promueve el crecimiento de queratinocitos, fibroblastos, condrocitos, células epiteliales, células de carcinoma de mama y diversas líneas de células leucémicas.⁽²⁸⁾

TABLA 6. Características y propiedades de TIMP⁽²⁸⁾				
PROPIEDAD	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Proteína madura (kDa)	28	22	22 o 27	22
Síntesis de N-glicosilación	2	0	1	0
Residuos de aminoácidos	184	194	188	194
pH	8,5	6,5	9,1	7,2
Proteínas de expresión	Inducible	Constitutiva	inducible	Inducible
unión proMMP	proMMP-9	proMMP-2	proMMP-2/-9	proMMP-2
inhibición de MMP	Todos	Todos	Todos	Más
Inhibición MT-MMP	Débil	Sí	Sí	Sí
Inhibición de ADAM	ADAM10	ADAM12	ADAM10/12/17/19/33;ADAMTS-1/-2/-4/-5	ADAM17/28
Proteína de localización	Soluble, superficie celular	Soluble, superficie celular	ECM, superficie celular	Soluble, superficie celular
Localización en superficie celular	Si	Si	Si	Si
Parejas de unión de superficie	CD63, LRP-1/MMP-9	$\alpha 3 \beta 1$ integrina, LRP-1	VEGFR2, angiotensina-IIIR, EFEMP1	
Efecto en proliferación	positivo y negativo	Positivos y negativos	Positivo	Positivo y negativo
Efecto en apoptosis	Negativo	Positivo y negativo	Positivo	Negativo
Efecto en diferenciación	Positivo y negativo	Positivo	Positivo y negativo	y
Efecto en angiogénesis	Positivo y Negativo	Negativo	Negativo	
Localización cromosómica	Xp11.23-11.4 17q23	17q25 22q12.1	22q13.2	3p25
mRNA (kb)	0.9	1.0 y 3.5	5.0	1.4

TIMP-1 se identificó por primera vez como un eritroide de actividad potenciadora y posteriormente, como un agente que estimula el crecimiento de algunas líneas celulares. TIMP-1 actúa en una vía de señalización intracelular que regula el

comportamiento celular.⁽²⁷⁾ En 1975 TIMP - 1 se descubrió como inhibidor de la colágena presente en el suero humano al ser liberado de fibroblastos de la piel. Entre 1985 y 1996 fueron identificados los tres TIMP. Los cuatro TIMPs humanos son endógenos naturales inhibidores de las metaloproteasas de la matriz extracelular.⁽²⁸⁾

2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Esta reacción consiste en agregar un par de cebadores llamados también primers, que flanquean la secuencia de DNA, en los extremos 5' del fragmento que se quiere amplificar. Los cebadores, son oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla, cuya secuencia es de entre 18 y 30 nucleótidos. La amplificación de un fragmento de DNA se lleva a cabo con la mezcla de la enzima polimerasa, fragmento de DNA, cebadores, dNTPs y Mg^{2+} . La mezcla se calienta 94°C provocando la desnaturalización del DNA, separando a las cadenas de DNA. Al disminuir la temperatura de la mezcla, los cebadores se unen a las cadenas separadas de DNA en la secuencia complementaria. La adición de la polimerasa permite la elongación de los cebadores, resultando dos copias del DNA original. Este proceso se repite y así se sintetizan exponencialmente las secuencias de DNA.⁽²³⁾ El método amplifica hasta mil millones de veces un segmento de DNA del genoma purificado, cada ciclo duplica la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo anterior. Una ampliación efectiva requiere de 20 a 30 ciclos de reacción con duración de 5 minutos aproximadamente cada uno.^(18, 29)

En 1957 se descubrió la DNA polimerasa. La enzima genera una cadena semiconservativa de DNA de la hélice de DNA utilizando una de las cadenas antiguas y otra apenas sintetizada por la DNA polimerasa. Las cadenas son apareadas con las bases correctas entre un desoxirribonucleósido trifosfato (A, T,

G, C) y el patrón de DNA. Para iniciar una síntesis de la cadena complementaria la DNA polimerasa requiere un cebador.⁽¹⁸⁾

Dado que un cebador de RNA contiene un nucleótido apareado adecuadamente de 5' a 3', el extremo de la cadena de 3' a 5' puede elongarse mediante la DNA polimerasa por este extremo para empezar por fragmento de okazaki. La síntesis de cada fragmento de okazaki acaba cuando esta DNA polimerasa se encuentra con el cebador de RNA unido al extremo 5' del fragmento anterior de DNA.⁽¹⁸⁾

Mediante métodos químicos se sintetizan dos cebadores de DNA seleccionados para adherirse a la secuencia de nucleótidos del gen deseado, los cebadores quedan en los extremos 5' de los fragmentos de DNA de una cadena simple. Con esta técnica se puede retrotranscribir RNA en secuencias de DNA con la enzima transcriptasa inversa.⁽¹⁸⁾

2.11 Retrotranscripción - Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El proceso de retrotranscripción consiste en una transcripción inversa de RNA mensajero (mRNA) en DNA complementario (cDNA) y la reacción en cadena de la polimerasa es la amplificación de la secuencia de cDNA obtenida. Estos dos procesos se pueden acoplar en uno, por eso se denomina (RT-PCR). Esta técnica de un sólo paso reduce la variabilidad de reacción para mejorar la duplicación de la retrotranscripción (RT) y proporciona un mayor rendimiento del cDNA.⁽²⁹⁾ Consiste en una mezcla de transcriptasa inversa (para la síntesis de cDNA) y de DNA polimerasa (para la amplificación por PCR). La DNA polimerasa es una enzima recombinante bloqueada por un anticuerpo que inhibe su actividad a temperatura ambiente. El anticuerpo se desnaturaliza y la actividad de la polimerasa se restablece durante la etapa de desnaturalización en el PCR a 94 ° C. La mezcla de RT-PCR contiene todos los componentes necesarios (buffer, dNTP's) para llevar a cabo tanto la retrotranscripción como la amplificación por PCR.⁽¹⁵⁾ En el proceso de retrotranscripción la enzima transcriptasa reversa,

obtenida de un retrovirus, presenta una frecuencia de error de 1 en 10^4 nucleótidos.⁽¹⁸⁾

Dado que la estructura del RNA como la del DNA poseen nucleótidos complementarios, se pueden generar híbridos de DNA /RNA de doble hélice que es la forma como la enzima retrotranscriptasa funciona. Por lo que el primer paso para una RT, es extraer el mRNA de las células, para tener las cadenas molde necesarias para generar un DNA complementario (cDNA) (Figura 10).⁽¹⁸⁾

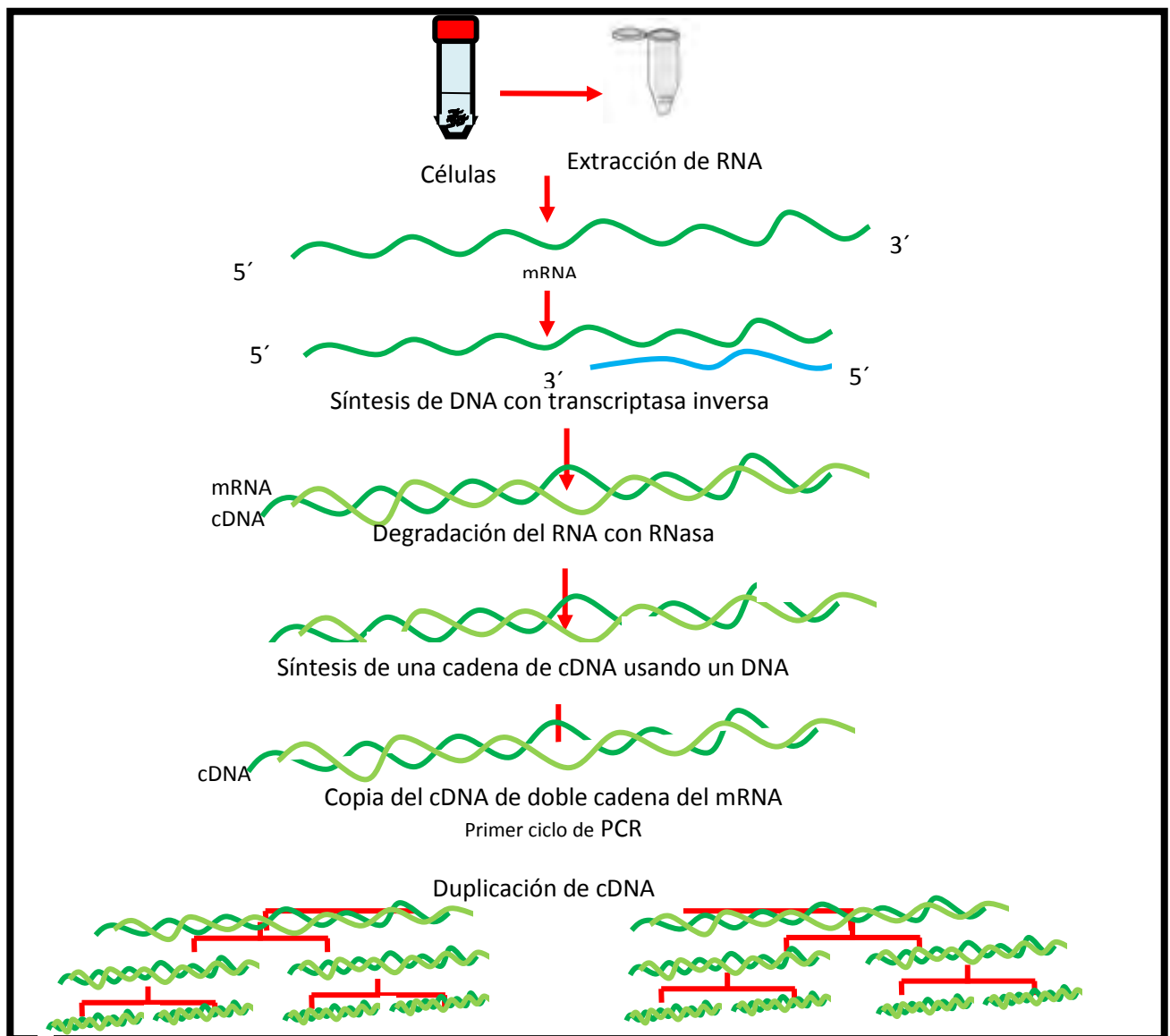


Figura 10. Extracción de RNA a través de células de Fibroblastos gingivales humanos y amplificación de cDNA a través del método de RT-PCR. modificado de (18)

2.12 Parámetros importantes del RT-PCR

- La alta calidad de RNA es esencial para el éxito en síntesis de cDNA.
- Entre los métodos recomendados para el aislamiento de RNA se incluye el Trizol.
- El uso de cebadores aleatorios no son recomendables.
- Se deben mantener todas las muestras, componentes y reacciones en hielo.
- Después de la preparación de las muestras, se transfieren a un termociclador.
- Dependiendo de la temperatura de alineación de los cebadores específicos para PCR se colocan los tubos en la posición correspondiente en un gradiente de temperatura del termociclador que va de 45 a 55 ° C.
- La síntesis de cDNA se logrará en una incubación de 15-30 min a 45-55 ° C.
- La DNA polimerasa se reactiva y el híbrido RNA / cDNA se desnaturaliza durante la incubación de 2 min a 94 ° C.⁽²⁹⁾

3. ANTECEDENTES

Algunos investigadores han demostrado que la síntesis de colágena en fibroblastos gingivales humanos no se ve afectada o inhibida por la CsA, estas discrepancias pueden originarse a partir de las condiciones de cultivo.⁽¹⁶⁾

La respuesta de hipersensibilidad al uso de CsA está directamente relacionada con los fibroblastos gingivales. Dichos fibroblastos incrementan la producción de colágena y matriz extracelular configuradas de forma densa. Esta respuesta se ve exacerbada en presencia de placa dentobacteriana.^(8, 30)

La alta incidencia y recurrencia de AG en pacientes trasplantados tratados con CsA, precisa de la búsqueda de fármacos sustitutos o terapias alternativas que complementen el tratamiento médico inicial. Para lograr este objetivo es necesario ampliar el conocimiento respecto a los cambios celulares y fisiológicos que sufre el tejido periodontal.⁽¹³⁾

3.1 Cambios de las moléculas de MMP y TIMP

Diversas enzimas están involucradas en la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Las MMP pertenecen a este tipo de enzimas y se clasifican en colagenasas, gelatinasas, estromelisinas y matrilisinas. La colágena es degradada principalmente por colagenasas.⁽¹⁵⁾

Se compararon tres grupos de fibroblastos gingivales humanos. El primero proviene de individuos sanos, el segundo de paciente con AG inducido por CsA y el tercero de un individuo sano, cuyos fibroblastos fueron tratados con CsA durante 3 meses con 500 ng/mL. La producción de MMP-1 en los fibroblastos derivados del paciente tratado con CsA y con agrandamiento gingival aumentó en comparación con los otros grupos. La producción de TIMP-1 en los fibroblastos derivados del paciente tratado con CsA y con AG disminuyó en comparación con el grupo control.⁽³¹⁾

Se realizó un estudio comparativo de los niveles expresión de MMP- 1 con cultivos de fibroblastos de cuatro individuos en tratamiento con CsA y que presentaron agrandamiento gingival y cuatro en tratamiento con CsA que presentaron un periodonto sano. Se utilizaron las células al pase 4º y 8º y se administró a los cultivos 200, 400, ó 800 ng / ml en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) el cuál fue retirado después de 24, 48, y 72 horas. Se midió la expresión de MMP-1 por espectrofotómetro a 490-520 nm. El grupo de CsA con agrandamiento gingival mostró un aumento a los 400 ng/48 h y 72 h, 800 ng/24 h, 48 h, y 72 h. En el grupo con periodonto sano se encontró una concentración alta, en 800 ng/48 h y 72h.⁽³²⁾

En otros estudios con biopsias de pacientes con enfermedad periodontal, se cultivaron los fibroblastos gingivales a 37°C con 5% de CO₂ y fueron subcultivadas hasta el pase 8 en cajas de 96 pozos con 10 µM Fenitoína, 10 µM de Nifedipino o 1µM de Ciclosporina A durante una semana. El resultado fue un incremento en la producción de MMP-1.⁽⁴⁾

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El AG genera alteraciones estéticas y problemas periodontales en los pacientes que las poseen, un porcentaje alto de pacientes inmunosuprimidos medicados con CsA sufren de este padecimiento. La única forma de tratar el agrandamiento (cuando el medicamento es un tratamiento de por vida) es la cirugía periodontal. Con el propósito de entender mejor los mecanismos celulares que subyacen al agrandamiento gingival provocado por tratamientos crónicos de CsA. En el presente trabajo de investigación se analizaron algunos aspectos de la síntesis y degradación de colágena. En específico se hizo la comparación de la expresión de colágena tipo I (COL-1), metaloproteasa tipo I (MMP-1) y su inhibidor (TIMP-1) entre una línea de fibroblastos gingivales derivada de un paciente con agrandamiento gingival inducido el fármaco inmunosupresor, y una línea de fibroblastos gingivales derivados de un individuo sano.

5. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El uso de fármacos inmunosupresores, como la CsA en pacientes que se realizaron trasplantes, conllevan a efectos secundarios como es el AG. Dado que el AG promueve alteraciones en la matriz extracelular de los pacientes que la padecen. El propósito del presente estudio fue determinar específicamente cambios en la expresión de la colágena tipo I, de la metaloproteasa tipo I y del inhibidor de la metaloproteasa tipo I en cultivos de fibroblastos gingivales humanos derivados de un individuo sano y de un paciente con AG tratado con CsA.

6. HIPÓTESIS.

La Ciclosporina A promueve la expresión de colágena tipo I.

La Ciclosporina A reduce la expresión de metaloproteasa tipo I.

La Ciclosporina A promueve la expresión de inhibidor de metaloproteasa tipo I.

7. OBJETIVO

Determinar la expresión de colágena tipo I (COL-1), MMP-1 y TIMP-1 en fibroblastos derivados de un individuo sano y de un paciente con AG tratado con CsA, mediante la técnica de RT-PCR.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares obtenidas en el laboratorio. Las líneas celulares corresponden a fibroblastos derivados de un paciente con AG causado por CsA (CsA_1) y de fibroblastos derivados de un individuo sano (IS_1). Las células se criopreservan en nitrógeno líquido.

8.2 Descongelación de líneas celulares

Se substrajeron crioviales de las dos líneas celulares del tanque de nitrógeno líquido y se colocaron al instante en hielo seco. Se descongelan las células en un baño de agitación constante a una temperatura de 37°C. Posteriormente se recuperan las células preservadas (*Figura 11*)

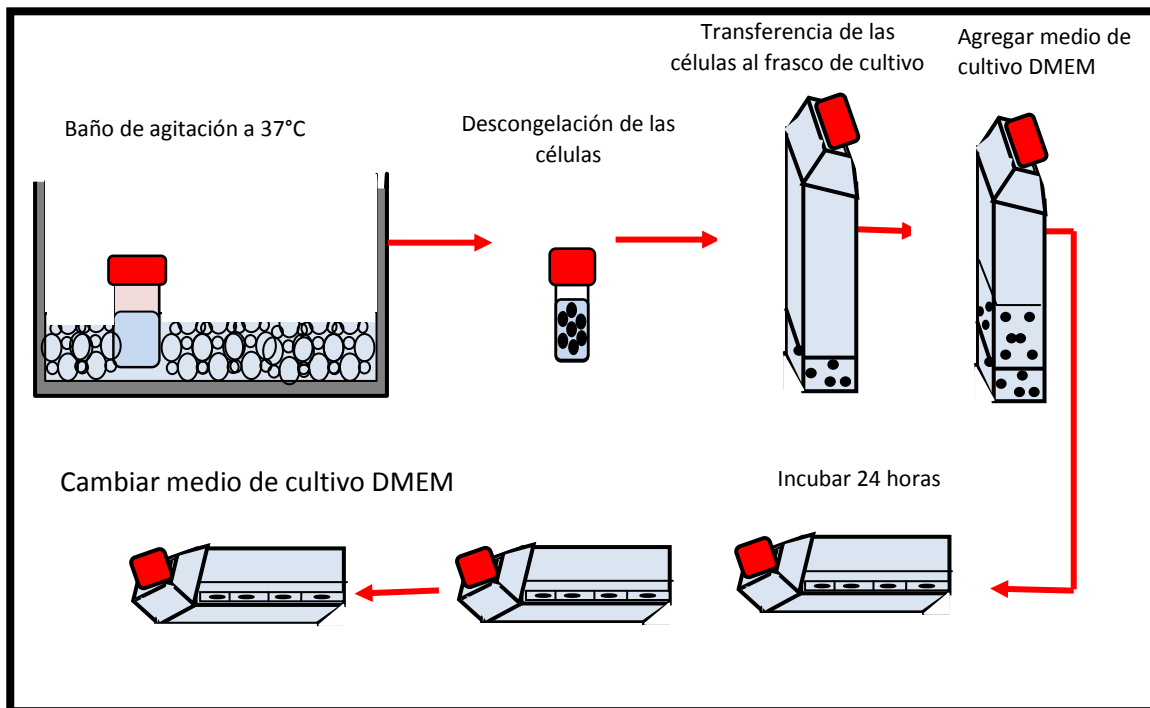


Figura 11. Los crioviales que contienen las células son extraídos del tanque de nitrógeno líquido, y sometido rápidamente a un baño de agitación. Las células son sembradas en frascos de cultivo T

75cm³ con medio de cultivo DMEM. modificado de (33)

8.3 Cultivo celular

Las líneas celulares se manejan en un ambiente estéril en la campana de flujo laminar horizontal. Las células se resuspenden en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) y suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), 8 mM de L-glutamina (GIBCO) penicilina/ estreptomicina/ anfotericina B (50,000 unidades/mL, 50,000 µg/mL y, 25 µg/mL, GIBCO). Se incubaron a 37°C y con una atmosfera húmeda de 5% de CO₂.

Cada tercer día se realizó el cambio de medio de cultivo en ambas líneas CsA_1 e IS_1. Se llevó un control del crecimiento celular. Las líneas celulares se fotografiaron y se observaron en un microscopio invertido a 20x (*Figura 12*). Las líneas celulares se subcultivaron una vez que se alcanzó la confluencia.

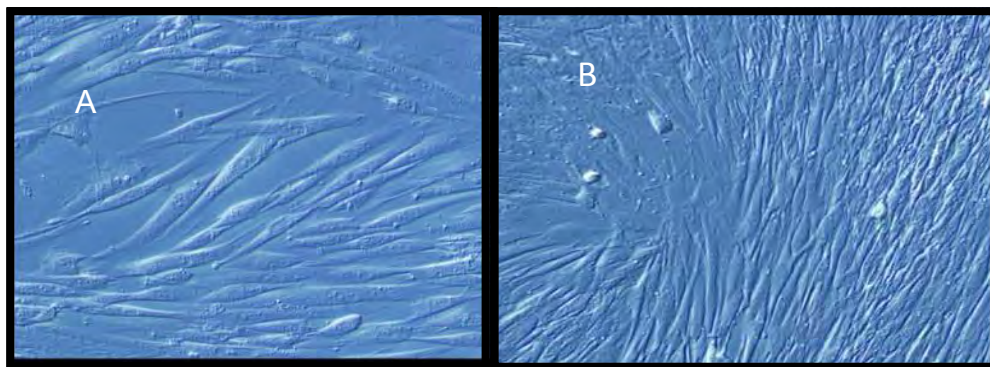


Figura 12. Micrografía a 20x. A) Fibroblastos gingivales humanos en semiconfluencia B) Fibroblastos gingivales humanos en confluencia.

8.4 Extracción de RNA por técnica de trizol

Cultivos confluentes de IS_1 y CsA_1 fueron utilizados para extraer RNA total. Estas células fueron mantenidas en cajas de 6 pozos (*Figura 13*).

Una vez que los cultivos de ambas líneas celulares llegaron a confluencia, en la caja de 6 pozos, se prosiguió a retirar el medio de cultivo DMEM de cada pozo y

se colocaron 2 ml de amortiguador de fosfatos salino (PBS) en cada uno de ellos realizando una ligera agitación. El PBS fue descartado. El siguiente paso fue agregar 1 ml de trizol al primer pozo, succionando y regresando con una micropipeta de 1000 μ l hasta desprender todas las células de la superficie. Este paso se realiza para tres pozos. Se pasa el trizol al segundo y finalmente, al tercer pozo. Se recuperan las células de los tres pozos en un tubo eppendorf (*Figura 13*).

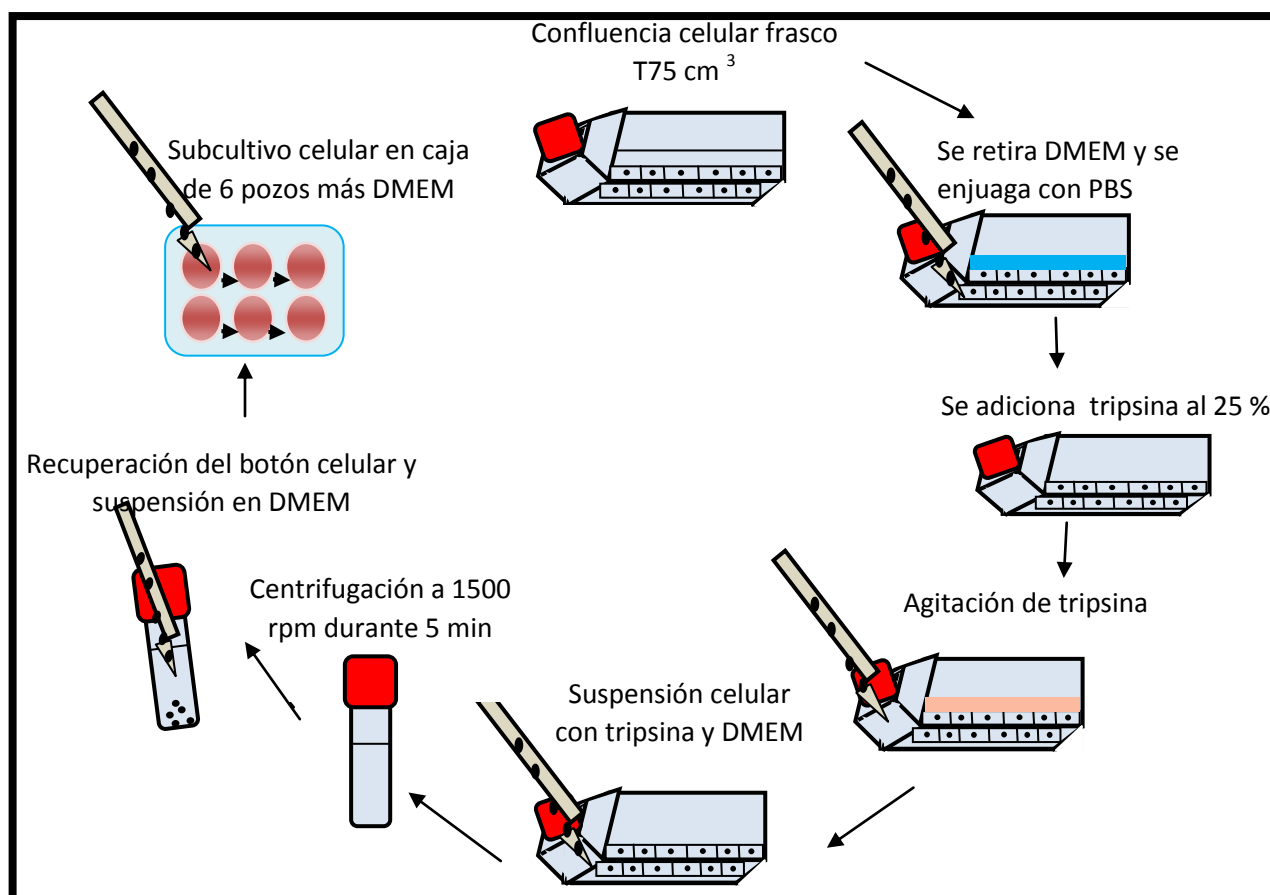


Figura 13. Las células al llegar a confluencia son sembradas y subcultivadas en cajas de 6 pozos e incubadas a 37°C en una atmosfera húmeda de 5% de CO₂. ^{modificado de (33)}

Posteriormente se agregaron 200 μ l de cloroformo a cada tubo y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 5 min, formándose dos fases. La fase acuosa superior fue transferida a otro tubo Eppendorf, se agregaron 500 μ l de isopropanol y se agitó por 10 segundos en

vortex para después reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron nuevamente a 12,000 rpm por 5 min a 4°C para obtener el botón de RNA. Se prosiguió a agregar 1 ml de etanol al 75% para ser centrifugado por última vez a 7,500 rpm a 4°C por 5 min. El etanol fue removido y se dejó secar a temperatura ambiente, por último se disolvió el botón de RNA en 30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). El botón de RNA se incubó en un termoblock a 55°C por 5 min. Se congelaron las muestras a -70°C, hasta su uso (Figura 14).

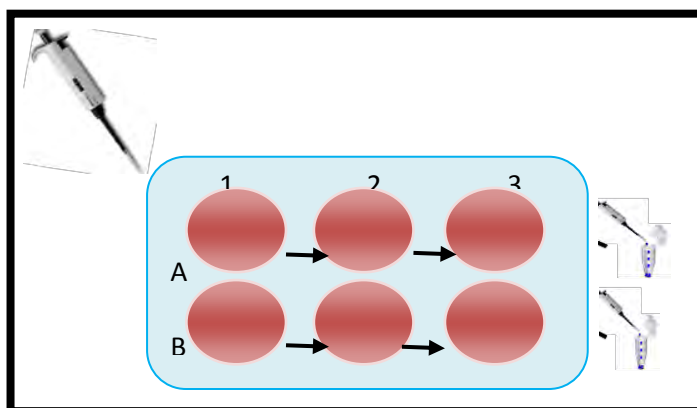


Figura 14. Extracción del RNA de los fibroblastos sanos de la línea celular IS_1 y de fibroblastos de la línea celular CsA_1 de una caja de 6 pozos. El trizol es pasado del primer pozo, al segundo y tercer pozo. modificado de (33)

8.5 Cuantificación de RNA

La manipulación de las muestras de RNA se realizó con guantes para la descongelación de las alícuotas a 4°C para su preservación y cuantificación en el espectrofotómetro, Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). La ventaja de este equipo radica en que únicamente necesita 1-2 µl de muestra, para determinar su concentración y el factor de pureza (Figura 15).

Se prepararon alícuotas de 10 µl (2.5ng/ µl) de cada una de las muestras de RNA y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso.

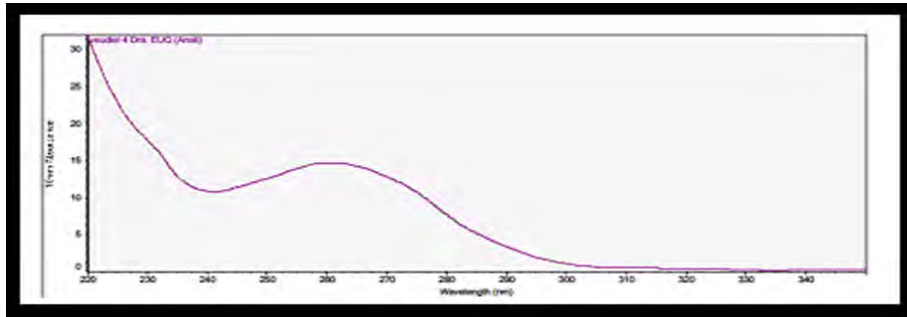


Figura 15. Concentración de ácidos nucleicos (575.8 ng/μl); A260 (26.287); A280 (13.7); 260/280 (1.92); 260/230 (1.06); Tipo RNA; Factor 40.

8.6 Nanodrop 2000c

El Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) es el único espectrofotómetro de microvolumen que integra una tecnología patentada para la retención de muestras pequeña de 1 μl hasta 2 μl. El Nanodrop 2000c se encuentra pre-configurado para determinar la concentración de DNA, RNA (A260), proteínas (A280) y pureza de la muestra (260/280). El software es de fácil uso e incluye métodos personalizados y de exploración de datos (*Figura 16*).



Figura 16. Nanodrop 2000c⁽³⁴⁾

La cuantificación del RNA se basa en medidas de absorbancia mediante electrofotometría, utilizando el rango de luz ultravioleta (UV). El método

espectrofotométrico está basado en la medida directa de la absorción de la radiación electromagnética por parte de la muestra.

8.7 Integridad del RNA

Se emplea una electroforesis en gel de agarosa (polisacárido de algas marinas), mediante el campo eléctrico, se separan, de acuerdo al tamaño los ácidos nucleicos. Los cuales migran hacia el polo positivo porque los grupos fosfato le importan una carga negativa. Las moléculas de RNA o DNA son imperceptibles por lo que se tiñe con bromuro de etidio, que al ser expuesto a luz ultravioleta emite fluorescencia (*Figura 17*).³⁵⁽³³⁾

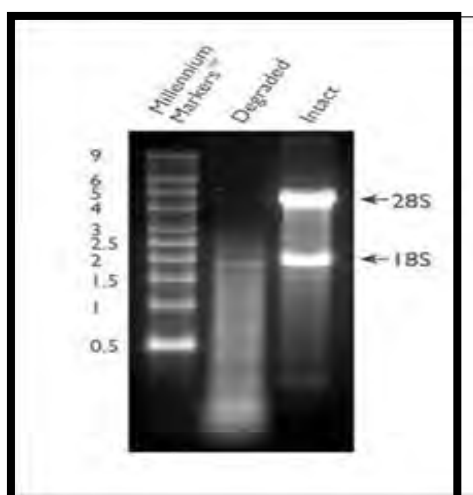


Figura 17. Integridad del RNA.⁽³⁵⁾

8.8 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Cuando las moléculas de DNA se calientan a 96°C o se expone a un pH alto se rompen los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias que mantienen unidas las dos cadenas de la doble hélice causando su separación, este proceso es denominado desnaturalización del DNA. Para obtener el RT-PCR de CsA_1 e

IS_1 se utilizó el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen) para realizar en un solo paso el procedimiento.

Una vez obtenida la concentración se prosiguió a diluir las muestras a una concentración de 25 ng/ µl.

Se realizó una mezcla para 5 muestras de CsA_1 y otra para IS_1 según se especifica en la *tabla 7*. Las secuencias de los cebadores para COL-1; MMP-1, TIMP-1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se encuentran en la *tabla 8*. El GAPDH se utilizó como control interno.

Tabla 7. Mezcla de Amortiguador para una muestra

Reactivos	Volumen/50 µl	Concentración Final
2x Mezcla de reacción	25 µl	1x
RNA muestra	1 µL	25ng
Primer Fw (10 µM)	1 µL	0.2 µm
Primer Rw (10µM)	1 µL	0.2 µm
RT platinum Taq Mx	1 µL	-----
Agua tratada con DEPC	2 µL	-----

Las muestras de 50 µl fueron posicionadas en el termociclador de acuerdo a la temperatura óptima para el alineamiento de los cebadores y se corrieron por 20 ciclos con el programa 1 de la *Tabla 9*. Al término de estos ciclos se extrajeron 25 µl de cada muestra, y los 25 µl restantes se volvieron a colocar en el termociclador con 12 ciclos más, con el programa 2 de la *Tabla10*, para completar un total de 32 ciclos (*Figura 18*).

Tabla 8. Cebadores forward/ reverse para RT-PCR.⁽³⁶⁾

Cebador Forward	Cebador Reverse	Longitud F/R	Producto final (bp)	Temp
COL-1 5'-GGC GGC CAG GGC TCC GAC - 3'	COL-1 3'-AAT TCC TGG TCT GGG GCA CC- 5'	18/20	347	61° C
MMP-1 5'-GGT GAT GAA GCA GCC CAG- 3'	MMP-1 3'-CAG TAG AAT GGG AGA TAC 5'	18/18	437	53° C
TIMP-1 5'- AGT CAA CCA GAC CAC CTT ATA CCA - 3'	TIMP-1 3'- TTT CAG AGC CTT GGA GGA GCT GGT C 5'	24/25	386	60° C
GAPDH 5'- ATT CCA TGG CAC CGT CAA GGC T - 3'	GAPDH 3'- TCA GGT CCA CTG ACA CGT T 5'	22/22	571	62° C

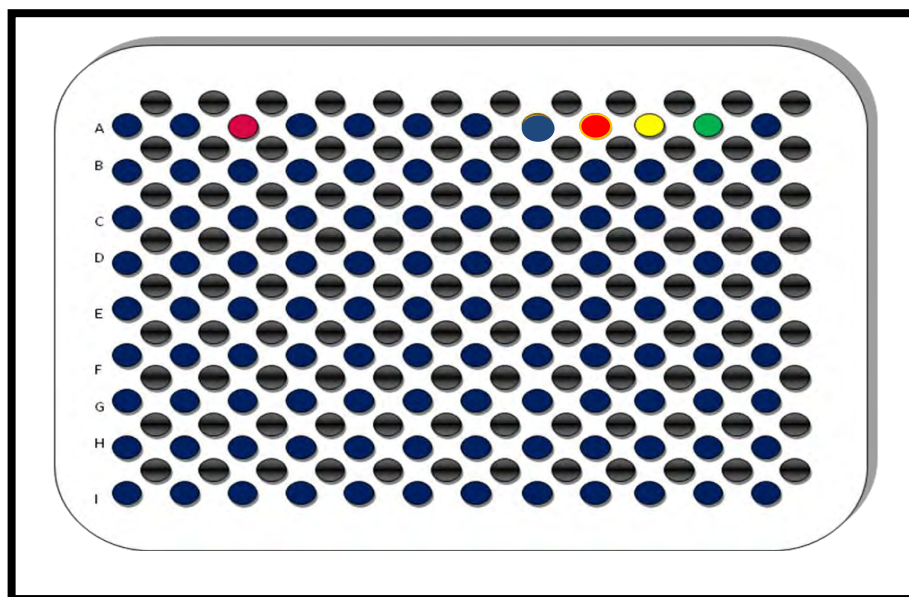


Figura 18. Representación del gradiente de termociclador.

Posición 3) Temp. de 53°C MMP-I. Posición 9) Temp. de 60°C TIMP-1.

Posición 10) Temp. De 61°C COL-1. Posición 11) Temp. de 62°C GAPDH.

Tabla 9. Programa del termociclador para 20 ciclos

Paso	Temperatura	Tiempo	Función
1	50C°	30 min.	Transcripción
2	94°C	2 min.	Desnaturalización de las cadenas
3	94°C	1 min.	Separación de las cadenas
4	56.8° +- 5°C		Los cebadores se unen a las cadenas
5	72°C	1 min.	Síntesis de DNA por la Taq polimerasa
6	GOTO	3 repeticiones de 20 ciclos	Número de repeticiones de ciclos del paso 3 al paso 5
7	Hold	15°	Tiempo restante
Tiempo final		2:30 horas	

Tabla 10. Programa del termociclador para 32 ciclos

Paso	Temperatura	Tiempo	Función
1	94C°	2 min.	Desnaturalización de las cadenas
2	94°C	1min.	Separación de las cadenas
3	56.8° +-5°C		Los cebadores se unen a las cadenas
4	72°C	1 min	Síntesis de DNA por la Taq polimerasa
5	GOTO	2 repeticiones de 15 ciclos	Número de repeticiones de los ciclos del paso 2 al paso 4
6	15°C	Hold	Tiempo restante
Tiempo final		1 hora	

9. RESULTADOS

Para conocer la integridad del RNA total obtenido con la técnica de trizol, se hizo un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se realizó una electroforesis a 80V durante 25 minutos. Se colocó un volumen de 5 µl de cada muestra, en cada carril. En los carriles 1 y 2 se encuentra el RNA obtenido de los fibroblastos de la línea IS_1 correspondientes al individuo sano. En los carriles 3 y 4 el RNA obtenido de los fibroblastos de la línea CsA_1 correspondientes al paciente tratado con CsA. Al realizar la electroforesis se observó en los cuatro carriles, la separación de dos bandas. La primer banda se expresó más ancha e intensa y corresponde a la subunidad 28s del RNA ribosomal y la segunda banda corresponde a la subunidad 18s del RNA ribosomal. Por lo que al observar estas dos bandas definidas, se comprueba que el RNA es de buena calidad (*Figura 19*).

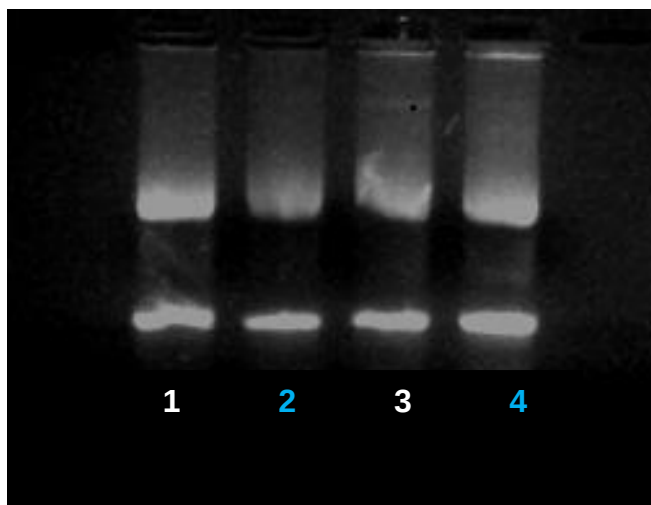


Figura 19. Carriles 1 y 2 corresponden al RNA de IS_1 y los carriles 3 y 4 al RNA de CsA_1

Una vez verificada la integridad del RNA se procedió a cuantificarla en el Nanodrop. La concentración de RNA para CsA_1 fue de 2582.6 ng/ µl y la de IS_1 fue de 1674.3 ng/ µl. Se prosiguió a diluir las concentraciones de RNA hasta tener 25 ng/ µl.

Las RT-PCR que se realizaron para las moléculas de MMP-1, TIMP-1, COL-1 y GAPDH. Ninguna de las amplificaciones fue detectable a los 20 ciclos. Sin

embargo, para los 32 ciclos ya se pueden ver los productos amplificados claramente en el transiluminador.

La expresión de los tres mensajeros aumentó en la línea celular Cys_1 al compararla con la línea IS_1. La expresión de colágena tipo I fue mayor en la línea CsA_1. Sin embargo, la expresión de MMP-1 fue mucho mayor. Interesantemente, la expresión de TIMP-1 también fue mayor que para la línea IS_1.

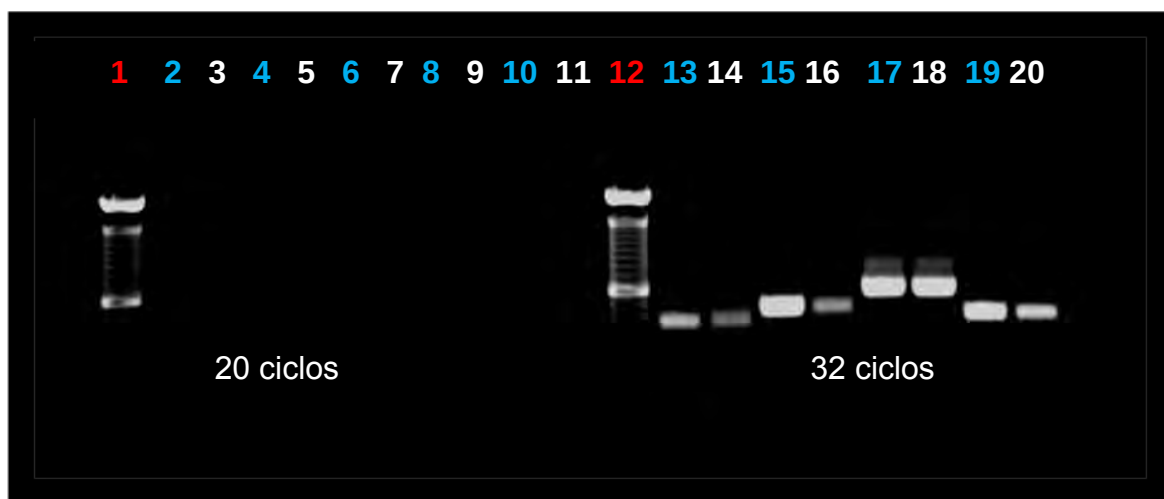


Figura 20. Carriles 1 y 12 Marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases (rojo). Carriles 2, 3, 13 y 14 Col-1. Carriles 4, 5, 15 y 16 MMP-1. Carriles 6, 7, 17 y 18 GAPDH y carriles 10, 11, 19 y 20 TIMP-1. Números en color azul corresponden a muestras de CsA_1 y en color blanco a IS_1.

10. DISCUSIÓN

En este trabajo cultivamos fibroblastos humanos derivados de individuos tratados con CsA y sanos. Pudimos explorar que los fibroblastos usados en este estudio se comportan similar a los cultivos de fibroblastos humanos expuestos a 800 ng/μl de CsA por 24, 48 y 72 horas in vitro.⁽³⁶⁾ En ambos casos se observaron aumentos en la cantidad de colágena expresada por RT-PCR.

En nuestro trabajo también mostramos que los cultivos de fibroblastos derivados del paciente tratado con CsA muestran una mayor cantidad de MMP-1 Y TIMP-1. La expresión de estas proteínas se ha medido en biopsias de pacientes con agrandamiento gingival y los resultados son similares a los nuestros ⁽³⁷⁾. Además, niveles de MMP-1 y TIMP-1 también han sido medidos por otros grupos con pruebas de ELISA, siendo las biopsias de agrandamiento gingival las que presentaban mayor producción de MMP-1 en comparación con los fibroblastos tratados con CsA. La MMP-1 entre los fibroblastos sanos y con agrandamiento gingival no presentó cambios significativos. A diferencia de nuestros resultados, en donde vimos un aumento en la expresión de TIMP-1, otro estudio muestra que los niveles de TIMP-1 en fibroblastos con agrandamiento bajaron en comparación con los fibroblastos sanos.⁽³¹⁾

En la encía normal la MMP-1 no es detectable y en encía con agrandamiento gingival la proteína está exclusivamente en el tejido conectivo. La MMP-1 es una enzima y transcripción es modulada por varias citoquinas que juegan un papel muy importante en el proceso de inflamación. Se ha demostrado aumentó de MMP-1 durante el curso de la gingivitis y periodontitis.⁽³⁷⁾

En este trabajo obtuvimos fibroblastos de un paciente tratado con una sola dosis de CsA. Existen datos que indican que la dosis y el tiempo de administración de CsA inhiben la expresión de mRNA de las MMP-1 a las 24 horas en una concentración de 500 ng/ml y 2000 ng/ml de MMP-1. Sin embargo, a las 6 y 12 horas no hubo efecto.⁽³⁸⁾ También se demostró una disminución de mRNA de TIMP-1 a las 6 horas en los cultivos con dosis de 100 ng/ml y 2000 ng/ml, sin

observar efecto a las 24 horas. Sin embargo después de 24 horas de administrar la CsA a 500 ng/ml y 2000 ng/ml hubo una disminución de TIMP-1. Estos datos nos hacen pensar que los efectos de la CsA pueden ser muy diferentes en cada individuo al variar las dosis y tiempos de administración, por lo que el tratamiento odontológico se debería realizar también de forma individual.

Aunque nuestros resultados no son cuantitativos en comparación con otros estudios en donde se mostró un aumento de 1,97 veces en la expresión de genes de MMP-1, un aumento de 2,3 veces para TIMP-1 ⁽³⁷⁾, podemos afirmar que, los fibroblastos gingivales derivados de los pacientes conservan el fenotipo inducido por el fármaco, lo que lo hace un buen modelo para conocer los cambios bioquímicos que promueve el AG de manera individualizada y en un futuro poder proponer estrategias terapéuticas específicas para cada caso.

11. CONCLUSIÓN

En este estudio se concluye que las moléculas de síntesis y degradación de colágena del paciente tratado con Ciclosporina A presentan un aumento en la producción de colágena tipo I, metaloproteasa tipo I y del inhibidor de la metaloproteasa tipo I. Al existir una mayor producción de colágena tipo I en la matriz extracelular, las células aumentan la producción de moléculas de metaloproteasas arrojándolas a la matriz extracelular por lo que comienza la degradación de colágena. Al inhibirse la degradación por el aumento de la expresión del inhibidor de la metaloproteasa tipo I y tener una sobreproducción de colágena se presenta una desregulación en la homeostasis síntesis-degradación de colágena, lo que conlleva un agrandamiento gingival inducido por la ingesta de Ciclosporina A.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza Periodontología Clínica. 10 ed. México: Mc Graw Hill; 2010
2. Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Bergamini L, Calastrini F, Stabellini G. Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. J Periodontol. 1996;67(1):21-7.
3. Ghafari A, Poorabbas R, Takieh JA, Sepehrvand N, Kargar C, Hatami S. Gingival Enlargement and Its Risk Factors in Kidney Transplant Patients Receiving Cyclosporine A. Iranian Journal of Kidney. 2010;4(1):60-70.
4. Maita E, Sato M, Yamaki K. Effect of Tranilast of Matrix Metalloproteinase- 1 Secretion From Human Gingival Fibroblasts in Vitro. J Periodontol. 2004;75:1054-1060.
5. Trackman PC, Konturd AC. Connective Tissue Metabolism and Gingival Overgrowth. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 2004;15(3):165-75.
6. Lindhe J, Lang NP, Karring T. Clinical periodontology and implant dentistry. 5th ed. / edited by Jan Lindhe, Niklaus P. Lang, Thorkild Karring. ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.
7. Rateitschak-Plüss EM, Hefti A, Lörtscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. J Clin Periodontol. 1983;10(3):237-46.

8. Greenberg KV, Armitage GC, Shiboski CH. Gingival enlargement among renal transplant recipients in the era of new-generation immunosuppressants. *J Periodontol*. 2008;79(3):453-60.
9. Garrido M. Monitorización terapéutica de la Ciclosporina: Estado de la cuestión. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 2004.
10. Oettinger-Barak O, Machtei EE, Peled M, Barak S, L-Naaj IA, Laufer D. Cyclosporine A-induced gingival hyperplasia pemphigus vulgaris: literature review and report of a case. *J Periodontol*. 2000;71(4):650-6.
11. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore RJ. Rang y Dale Farmacología. 5 ed. Barcelona, España: Elsevier; 2008 Septiembre.
12. Quesada AJ, Redondo JM. La ruta de señalización CA^{++} /Calcineurina/NFAT en activación endotelial y angiogénesis: efectos de la ciclosporina A. *Nefrología*. 2003;23(3):44-8.
13. Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A, et al. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(1):E19-25.
14. Jung JY, Kang GC, Jeong YJ, Kim SH, Kwak YG, Kim WJ. Proteomic analysis in cyclosporin A-induced overgrowth of human gingival fibroblasts. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(8):1480-5.
15. Hypes MK, Pirisi L, Creek KE. Mechanisms of decreased expression of transforming growth factor-beta receptor type I at late stages of HPV16-mediated transformation. 2009;282:177-86.
16. Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T. Drug Induced Gingival Overgrowth a Review. 2005;28:1817—21.

17. McKleroy W, Lee TH, Atabai K. Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(11):L709-21.
18. Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología Molecular de la Célula*. 4 ed. Barcelona, España: Omega; 2006. 1461 p.
19. Nelson LD, Cox MM, Cuchillo C. *Principios de Bioquímica*. 4 ed. España: OMEGA; 2005.
20. Yamada H, Nishimura F, Naruishi K, Chou HH, Takashiba S, Albright GM, et al. Phenytoin and cyclosporin A suppress the expression of MMP-1, TIMP-1, and cathepsin L, but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2000;71(6):955-60.
21. Cascales AM, Álvarez GJ. Metaloproteinasas, Matriz Extracelular y Cáncer. *An R Acad Nac Farm*. 2010;76(1):59-84.
22. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Publising Group*. 2007;8:221-33.
23. Laguna J, Garza PE, Montes MF, Vázquez PJ, Rosas RH. *Bioquímica de Laguna*. 7 ed. México; UNAM. Facultad de Medicina: Manual Moderno; 2013 abril.
24. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(8):617-629.

25. Moon P, Weaver J, Brooks C. Review of Matrix Metalloproteinases. Effect on the Hybrid Dentin Bond Layer Stability and Chlorhexidine Clinical Use to Prevent Bond Failure. *The Open Dentistry Journal*. 2010;4:147-52.
26. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.
27. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002;115(19):3719-27.
28. Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013:1-14.
29. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript_onestepRTPCR_man.pdf.
30. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
31. Gulay T, Muhittin A, Methmet Y, Ismet G, Koksai B. Evaluation of Matrix Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Levels in Gingival Fibroblasts Of Cyclosporin A- Treated Patients. *J Periodontol*. 2002;73:1273-8.
32. Sonmez S, Cavdar C, Gunduz C, Nizam N, Biray C, Atila K, et al. Do MMP-1 levels of gingival fibroblasts have a role in the gingival overgrowth of cyclosporine-treated patients? *Transplant Proc*. 2008;40(1):181-3.
33. Freshney AI. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique and Especialized Applications*. 6 ed. Canada: Wiley-Backwell; 2010. 732 p p.
34. <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>.

35. <http://epidemiologiamolecular.com/analisis-perfil-expresion-genica-celulas-sangre-periferica/>.
36. Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF, et al. Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomed Pharmacother.* 2004;58(4):231-8.
37. Dannewitz B, Edrich C, P. T, Kohl A, Gabbert O, Eickhol P, et al. Elevated gene expression of MMP-1, MMP-10, and TIMP-1 reveal changes of molecules involved in turn-over of extracellular matrix in cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Cell Tissue Res.* 2006;325(3):513-22.
38. Hyland P, Traynor P, Myrillas T, Marley J, Linden G, Winter P, et al. The Effects of Cyclosporin on the Collagenolytic Activity of Gingival Fibroblasts. *J Periodontol.* 2003;74(4):437-45.

