



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES
CON AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
GEORGINA WENDTI GONZÁLEZ OROZCO**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**Dra. LILIAN GONZÁLEZ SEGURA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D. F. OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE	
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	
Epitelio Gingival	5
Componentes principales de la encía	7
Colágena	7
Síntesis y degradación de la colágena	8
Fibroblastos gingivales	10
Integrinas en los fibroblastos gingivales	11
Agrandamiento gingival inducido por fármacos	13
Fármacos promotores del agrandamiento gingival	16
Nifedipina y fibroblastos gingivales	18
Ciclosporina A y fibroblastos gingivales	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO	20
General	20
Particulares	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

CARACTERIZACION DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES CON AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis de maestría se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del **Dr. Carlos Rosales Ledezma** y fue apoyado en parte por el **Proyecto IN207514** de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y por el **Proyecto 168098** del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Carlos Rosales Ledezma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Lilian González Segura	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia

Porque sin su apoyo, una vez más, no habría llegado a la meta

A mis amigos

Mi otra familia, quienes comprendieron más allá de las palabras lo que quería comunicarles

A mis compañeros de laboratorio

Quienes me permitieron compartir y enriquecer diariamente ésta incomparable experiencia

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma

Por su constante apoyo y dirección académica

A la Dra. Eileen Uribe Querol

Por proporcionarnos las células de fibroblastos gingivales y por su disposición para asesorarme.

A la M. en IBB Nancy Yorley Mora Perez

Por su excelente ayuda técnica durante el desarrollo de la fase experimental de este trabajo.

CARACTERIZACION DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES CON AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS.

Resumen

El agrandamiento gingival es un padecimiento definido como el aumento exagerado del volumen de las encías, su etiología y severidad tiene relación con diversos factores. En 1999 la Asociación Americana de Periodontología (AAP), incluyó a los agrandamientos gingivales como una enfermedad inducida por placa. Dentro de esta clasificación también se incluyen agrandamientos gingivales cuya etiología no es causa de una mala higiene bucal, sino de los efectos adversos de fármacos como la Nifedipina, la Fenitoina y la Ciclosporina A, en este caso el padecimiento se conoce como "Agrandamiento Gingival Inducido por Fármacos" y fue descrito por primera vez por Kimball en 1939. El agrandamiento gingival inducido por fármacos afecta no sólo de manera estética a los pacientes que lo sufren, sino también impide funciones como la masticación y el habla. Actualmente, su tratamiento está dado únicamente por procedimientos de extracción quirúrgica, ya que se desconocen los mecanismos fisiológicos y moleculares que guían esta respuesta.

Algunos estudios señalan que este agrandamiento podría estar relacionado con un incremento en el número total de fibroblastos presentes en los tejidos periodontales, pero estos análisis han sido principalmente evaluados en modelos animales. En el caso de tejidos humanos existe una controversia sobre esta explicación. Otros estudios, sugieren cambios en la expresión de diversas moléculas, entre ellas algunas relacionadas con procesos proinflamatorios, crecimiento y división celular, y reconocimiento, síntesis y degradación de moléculas de matriz celular. Sin embargo, no existe consenso sobre los mecanismos que generan el agrandamiento gingival inducido por fármacos.

Para determinar si este padecimiento se debe a alteraciones en el comportamiento celular o bien a cambios en las moléculas que reconocen a las proteínas de matriz extracelular, en este trabajo se compararon fibroblastos gingivales derivados de individuos sanos con los fibroblastos de pacientes con agrandamiento gingival inducido por los fármacos Nifedipina y Ciclosporina A.

Primeramente se caracterizó la velocidad de crecimiento de los diversos fibroblastos en cultivo, encontrándose que el proceso de agrandamiento gingival no es causado por un mayor número de células en la encía. Después se caracterizó la expresión en la superficie celular de integrinas. Éstas son moléculas que reconocen colágena y fibronectina (componentes estructurales de la encía). Usando citometría de flujo se observaron diferencias en el patrón de expresión de las integrinas. Se encontró que la integrina $\alpha 5$ deja de expresarse en los fibroblastos provenientes de pacientes que toman Nifedipina y que la integrina $\beta 3$ deja de expresarse en los fibroblastos provenientes de pacientes que toman

Ciclosporina A. Como consecuencia de este resultado también se caracterizó la adhesión de los fibroblastos a colágena y fibronectina. Se encontró que los fibroblastos gingivales se adhieren preferentemente a fibronectina y no a colágena. La avidéz con que las células se adhieren a fibronectina también cambia, siendo casi 2.5 veces más grande en los fibroblastos derivados de pacientes que toman Nifedipina. Finalmente, al bloquear selectivamente cada integrina con anticuerpos monoclonales específicos, se encontró que las integrinas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ son responsables de la adhesión a fibronectina. Estos datos son relevantes, puesto que no concuerdan del todo con los resultados de expresión de integrina $\alpha 5$.

En conclusión, en este trabajo encontramos que el agrandamiento gingival inducido por fármacos no es el resultado de un efecto hiperplásico de los fibroblastos gingivales, sino que involucra alteraciones en la expresión de integrinas, lo cual sugiere que hay cambios en los procesos de formación y degradación de las proteínas que forman las encías.

CHARACTERIZATION OF FIBROBLASTS FROM PATIENTS WITH DRUG-INDUCED GINGIVAL OVERGROWTH.

Abstract

Gingival overgrowth is a disease where gum tissue gets abnormally large. Its origins and severity are related to multiple factors. In 1999 the American Association of Periodontics (AAP) defined gingival overgrowth as a disease induced by bacterial plaque. However, within this classification, gingival overgrowth caused as a side effect of certain drugs such as Nifedipine, Phenytoin, and Cyclosporine A, is also included. In this case, the disease is known as “Drug-induced gingival overgrowth”, and Kimball first described it in 1939. Drug-induced gingival overgrowth affects not only the esthetic appearance of the patient, but also important functions such as mastication and speech. Today, the only treatment for this disorder is surgical removal of the excessive tissue, since the physiological and molecular mechanisms causing it are not known.

Some studies indicate that this gingival overgrowth could be due to an increase in the total number of fibroblasts in periodontal tissues. However, these studies have used mainly animal models. Studies using human tissues have reported controversial results. Other studies suggest that alteration in the expression level of various proteins is the cause of the disease. Proposed molecules include those involved in inflammation, cell proliferation, cell adhesion, and remodeling of the extracellular matrix.

In order to determine whether the drug-induced gingival overgrowth is due to changes in cell behavior or changes in molecules that bind to proteins of the extracellular matrix, in this study gingival fibroblasts, derived either from normal subjects or from patients with Nifedipine- or cyclosporine A-induced gingival overgrowth, were compared.

First, growth rate of fibroblasts in culture was characterized. It was found that gingival overgrowth is not caused by a larger number of cells in the gum. Next, the cell surface expression of integrins was characterized. Integrins are molecules that bind collagen and fibronectin (proteins that form the gum). By flow cytometry, it was found that $\alpha 5$ integrin is no longer expressed on fibroblasts derived from patients under Nifedipine treatment, and that $\beta 3$ integrin is no longer expressed on fibroblasts derived from patients under Cyclosporine A treatment. After this result, fibroblast adhesion to collagen or fibronectin was also characterized. It was found that gingival fibroblasts adhere preferentially to fibronectin and not to collagen. The avidity of integrins to fibronectin was also altered, being about 2.5 fold higher in fibroblasts derived from patients taking Nifedipine. Finally, selective of particular integrins with specific monoclonal antibodies it was found that $\alpha 4$ and $\alpha 5$ integrins are the ones responsible for cell adhesion to fibronectin. These data are interesting because they do not agree completely with the results for $\alpha 5$ integrin expression.

In conclusion, in this report we found that the drug-induced gingival overgrowth is not due to hyperplasia of gingival fibroblasts, but it involves changes in the level of expression of integrins on the cell surface. This suggests that this disease involves in part changes in the process of remodeling of the proteins that form the gum via integrin signaling.

CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES CON AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS.

INTRODUCCIÓN

Epitelio gingival

Dentro de los órganos que constituyen el sistema bucal se encuentran: la encía o periodonto de protección, los labios, las mejillas, la lengua, el paladar, los dientes y las glándulas salivales (Fig. 1). El sistema bucal, realiza funciones múltiples y específicas como la masticación y la trituración de alimento, la secreción de saliva, la absorción de nutrientes, la gustación, la fonación y el lenguaje articulado (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

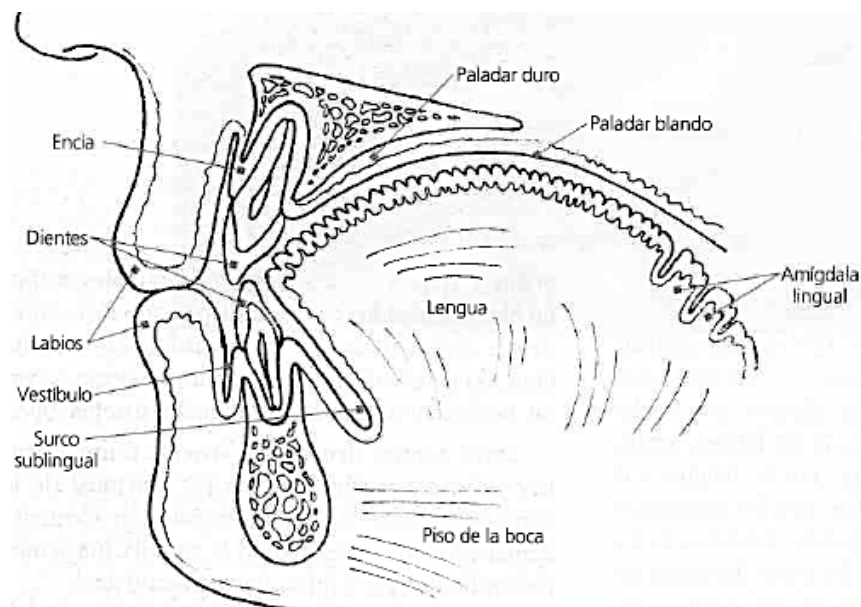


Fig. 1 **Esquema de la anatomía de la cavidad oral.** (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

La encía recubre al aparato de sostén de las piezas dentarias y comprende dos regiones: la encía que rodea al cuello dentario y la unión dentogingival que une la encía a la pieza dentaria (Fig. 2). La encía presenta dos tejidos que se interaccionan para su adecuado funcionamiento (Fig. 3): por un lado el tejido epitelial de origen ectodérmico y por el otro el tejido conjuntivo. El tejido epitelial puede ser queratinizado o paraqueratinizado y está formado por cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo. El tejido epitelial se encuentra formando una barrera funcional de células entre el medio bucal y el tejido conjuntivo subyacente. Este último tejido, también conocido como tejido conjuntivo o lámina propia, tiene origen embrionario mesenquimal, y es el encargado de proporcionar sostén y nutrición al epitelio (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

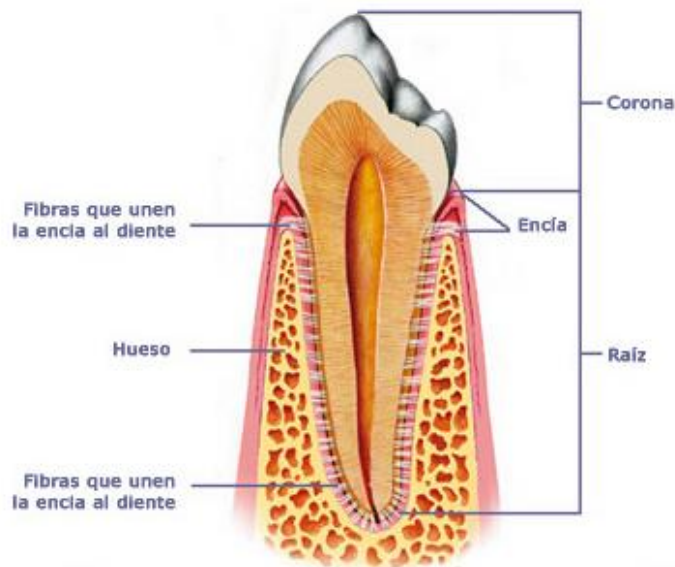


Fig. 2 **Esquema de la anatomía del diente y el periodonto.** La imagen muestra las diferentes porciones en las que se estudia a las piezas dentales, la corona es la porción osea que está expuesta, la encía es la porción del periodonto que está inmediatamente después de la corona, puede ser libre o adherida donde se une la encía a la pieza dental. La raíz va desde el cuello de la corona, hasta la unión con los huesos del maxilar, incluye al hueso alveolar, el ligamento periodontal, el cemento y la propia raíz de la pieza dental. (<http://www.ortodonciadultos.com/tag/anatomia-dental/>)

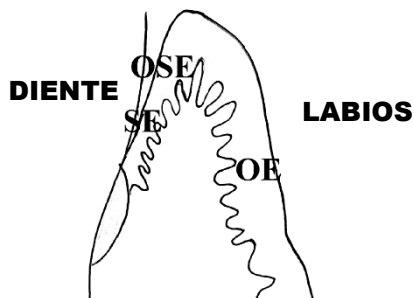


Fig. 3 **Esquema de la anatomía de la encía.** En la ilustración que representa un corte transversal de la encía, la pieza dentaria se ubica a la izquierda y los labios a la derecha del corte. Se pueden observar tres regiones, OE: epitelio bucal, OSE: epitelio del surco, SE: epitelio de unión (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

Ambos tejidos, el epitelial y el conjuntivo interactúan a partir de la presencia de papilas o crestas que tienen un espesor variable, con un número y grosor de papilas que varía según la región. El tejido epitelial y el conjuntivo se encuentran separados por la membrana basal, que consiste en una banda acelular glucoproteica, constituida por dos láminas basales, una sintetizada por las células basales epiteliales y otra por el tejido conjuntivo (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009).

La encía, que forma parte de la mucosa bucal masticatoria tiene dos regiones respecto a la firmeza de su fijación: encía libre o marginal y encía fija o adherida (Fig. 2). La encía libre que es la región de la mucosa que no está unida al hueso subyacente y que se extiende desde el borde gingival libre, hasta el surco gingival marginal, corresponde aproximadamente al

límite cemento- adamantino. La encía fija se encuentra unida al periostio del hueso alveolar, extendiéndose desde el surco gingival libre hasta la unión o surco mucogingival que separa la mucosa masticatoria de la mucosa del revestimiento alveolar (raíz de los dientes).

Histológicamente la encía está compuesta por los siguientes elementos:

- Fibras de colágenas (alrededor del 60% del volumen del tejido conjuntivo) y pueden estar maduras o inmaduras.
- Fibroblastos (alrededor del 5%)
- Vasos sanguíneos, nervios y matriz (aproximadamente 35%)

Otros componentes celulares de la encía con menor presencia son células del sistema inmunológico como mastocitos, macrófagos, granulocitos, neutrófilos, linfocitos; y pericitos (Newman, Takei et al. 2010).

Componentes principales de la encía

Colágena

Las fibras de colágena son el componente principal de la matriz extracelular de la encía (Kato, Okahashi et al. 2005). La colágena es uno de los componentes proteicos que confieren funciones estructurales y adherentes al tejido conjuntivo. Histológicamente la colágena está considerada como el componente principal de la piel y los huesos, es la proteína más abundante en los mamíferos, y cerca del 25% de las proteínas de un animal. Es sintetizada por los fibroblastos activos del tejido conjuntivo. Hasta ahora se conocen 25 tipos de colágenas diferentes, las cuales presentan mínimas diferencias en su secuencia de aminoácidos, la estructura que adquieren sus fibras y su distribución en los tejidos (Alberts, Jhonson et al. 2002).

La estructura primaria de la colágena es altamente repetitiva, tiene un alto contenido de los aminoácidos glicina (Gly) y prolina (Pro), su secuencia consenso es Gly-Pro-X, en la que X puede ser cualquier aminoácido y la Prolina puede ser modificada postraduccionalmente a Hidroxiprolina. La gran cantidad de Pro y Gly en su estructura, permite el acomodo cercano de los aminoácidos en los polipéptidos y la formación de α -hélices como estructura secundaria a partir de la formación de puentes de Hidrógeno entre la cadena lateral de Gly con el grupo carbonilo del polipéptido de la cadena adyacente. La unidad clásica estructural de la colágena es una hélice formada por la unión de tres cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas α (Alberts, Jhonson et al. 2002, Shoulders and Raines 2009).

La formación de las fibras de colágena es el resultado de la asociación secuencial de estructuras protéicas en orden creciente. Se han descrito 25 cadenas α de colágena, codificadas por genes diferentes, los

productos de la expresión de estos genes, en combinaciones particulares dan como resultado uno de los 25 tipos de colágena que se han identificado en los diversos tejidos. Las colágenas I, II, III, V y XI, son las más expresadas en todos los tejidos y son conocidas como colágenas fibrilares. Los otros tipos de colágenas cumplen funciones accesorias recubriendo fibras, formando redes o favoreciendo el anclaje de diferentes tejidos (Alberts, Jhonson et al. 2002, Tavakoli, Bateni et al. 2011).

Síntesis y degradación de la colágena

La síntesis de colágena inicia con la producción de los polipéptidos o cadenas pro- α que se hidroxilan y glicosilan en algunas Prolinas y Lisinas para permitir la combinación de tres cadenas pro- α en una estructura helicoidal conocida como procolágena. Una vez que la colágena es secretada al espacio extracelular en forma de procolágena, es sujeto de tres eventos: 1) la remoción de los propéptidos que flanquean ambos extremos de la hélice, 2) la conversión de procolágena en colágena y 3) la formación de complejos fibrilares más largos, promovidos por la naturaleza insoluble de las fibras de colágena y por la polimerización de las mismas por medio de la Lisil-oxidasa. Estas fibrillas a su vez se asocian en estructuras más grandes, formando fibras de colágena visibles por microscopía óptica (Lodish, Berk et al. 2000, Alberts, Jhonson et al. 2002).

Los fibroblastos son las células encargadas del mantenimiento de la homeostasis entre la síntesis y degradación de la colágena en la matriz extracelular. Existen dos vías por las cuales la colágena más antigua es degradada y reemplazada posteriormente con fibras nuevas: la degradación extracelular de la colágena por metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés Matrix Metalloproteinases) que cortan la colágena en porciones asimétricas desde su extremo N-terminal y la fagocitosis de colágena por los fibroblastos (Abraham, Dice et al. 2007).

En la mayoría de los casos, la degradación se lleva a cabo de manera extracelular y es mediada por la acción de MMPs (Fig. 4), estas enzimas forman parte de una familia de 25 miembros, que son dependientes de metales como el cinc. Las metaloproteinasas pertenecen a la subfamilia de las matrixinas y son inhibidas por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs, por sus siglas en inglés: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) (Fig. 5). Dentro de las metaloproteinasas, la molécula más abundante y la primera en descubrirse fue la MMP-1. Esta enzima actúa como zimógeno, es activada por tripsina o compuestos organomercuriales y se encarga de cortar a la colágena en dos segmentos asimétricos desde su extremo N-terminal (Brinckerhoff and Matrisian 2002).

En el periodonto se ha reportado la participación de la MMP-2 también conocida como gelatinasa A y participa en el proceso de degradación de la colágena tipo VI (Sorsa, Tjäderhane et al. 2004). Esta metaloproteinasa tiene en el sitio catalítico secuencias repetidas similares a la fibronectina tipo III, que le permiten degradar también otro tipo de componentes de la

matriz extracelular como fibronectina y algunos glicosaminoglicanos. La gelatinasa B o MMP-9 degrada a la colágena tipo V, también es activada por compuestos de organomercuriales, es sintetizada por neutrófilos y es inhibida por la TIMP-1 (Woesner 2000). En las encías de pacientes con inflamación del peridonto (periodontitis) se ha detectado MMP-9 (Sorsa, Tjäderhane et al. 2004). En todos los tejidos corporales, la expresión de las moléculas MMP y TIMP en condiciones fisiológicas normales es prácticamente indetectable y su expresión se incrementa en procesos biológicos como la reproducción, la cicatrización y con algunas enfermedades (Abraham, Dice et al. 2007).

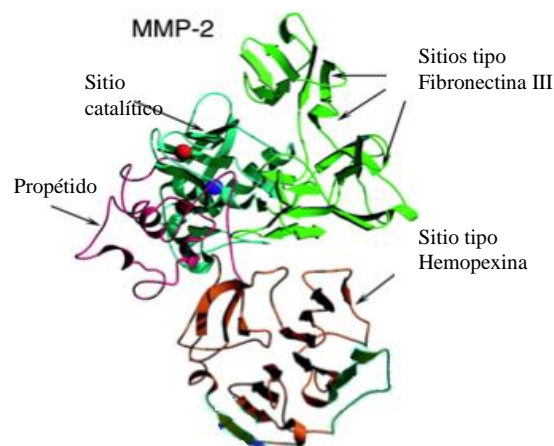


Fig. 4 **Modelo de la estructura secundaria de la MMP-2.** Se pueden observar las regiones más relevantes de la MMP-2, el sitio catalítico, que se puede unir también a TIMP, es la región tipo Hemopexina. Los puntos rojo y azul indican la posición de los cationes de cinc en otro de los sitios catalíticos (Morgunova, Tuutila et al. 2002).

Los inhibidores de las MMPs pertenecen a dos familias: las α 2-macroglobulinas y los TIMPs. Los TIMPs (Fig. 5) son moléculas que bloquean o inhiben la degradación de la matriz extracelular de manera específica. Existen cuatro inhibidores pertenecientes a esta familia: TIMP-1 y TIMP-2 que se unen de manera directa a la región similar a la hemopexina de las MMPs, ejerciendo control sobre el proceso de activación de las mismas. TIMP-3 y TIMP-4 son menos comunes y con funciones similares a TIMP-1 y TIMP-2, se localizan en tejidos específicos y parecen estar ausentes en la gran mayoría de los tejidos. Los TIMPs cumplen otro tipo de funciones, pueden unirse a las formas precursoras de las MMPs (proMMP) siendo éste un paso necesario para la activación de las MMPs y también tienen funciones que no están relacionadas con la inhibición de la acción de las MMPs, como regulación del crecimiento celular por acumulación en el núcleo durante la fase S; la inhibición de la convertasa de TNF- α por la TIMP-3 o la supresión de la apoptosis de células B por la TIMP-1 (Nagase and Woessner 1999, Woessner 2000, Brinckerhoff and Matrisian 2002).

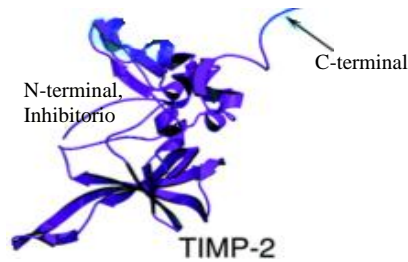


Fig. 5 **Modelo de la estructura secundaria del TIMP-2.** La porción C-terminal del TIMP-2 es la región por medio de la cual forma el complejo con la MMP correspondiente (Morgunova, Tuuttila et al. 2002).

Otra manera en la que los fibroblastos mantienen la integridad de los tejidos es fagocitando las fibras de colágena. La fagocitosis de colágena es una vía importante para la remodelación de la misma en todos los tejidos, ya que su interrupción está relacionada con la formación de lesiones fibróticas. Aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta fagocitosis aún no ha sido descrito del todo, se sabe que la fagocitosis inicia con la agrupación de receptores de membrana como las integrinas. La fagocitosis puede ser inhibida por fármacos como la ciclosporina A, la citocalasina B y la trans-eposuccinil-L-leuquilamindo(4-guanidino)butona (E-64) (Abraham, Dice et al. 2007).

Fibroblastos gingivales

Los fibroblastos son el componente celular principal del tejido conjuntivo (Shoulders and Raines 2009). Morfológicamente las poblaciones de fibroblastos en el organismo tienen forma ahusada y presentan diferencias en su actividad o quiescencia, en la síntesis de proteínas, en la respuesta a moléculas reguladoras y en su tasa de proliferación, entre otras (Nanci 2012). En general, los fibroblastos comparten funciones como:

- a) Regulación, síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular (tales como los glicosaminoglicanos, la colágena, la fibronectina y la vitronectina)
- b) Control de la contractilidad y movilidad
- c) Producción de citocinas involucradas en la regulación del tejido conjuntivo.

Funcionalmente los fibroblastos se observan en dos tipos celulares, distinguibles por su actividad metabólica: fibroblastos activos e inactivos. Los fibroblastos activos, como los fibroblastos del periodonto, presentan un núcleo abierto, alto contenido citoplasmático, numerosos complejos de Golgi, mitocondrias, vesículas secretoras y un amplio retículo endoplásmico rugoso. Los fibroblastos inactivos o fibrocitos presentan un citoplasma más pequeño y un núcleo segmentado (Acosta Gómez 2006, Kantarci, Nseir et al. 2011).

Dentro del periodonto se han identificado dos subpoblaciones de fibroblastos: fibroblastos del ligamento periodontal y fibroblastos

gingivales. Éstos últimos son una población celular que constituye el tejido conjuntivo blando (encía). Éstos producen y mantienen los componentes extracelulares que proveen integridad a este tejido.

Los fibroblastos gingivales se han caracterizado fenotípicamente, encontrando diferencias con respecto a poblaciones de fibroblastos dérmicos y del ligamento periodontal, presentando:

- Menor tasa de crecimiento celular (Lee and McCulloch 1997)
- Cambios en las características de adhesión y migración en proteínas de matriz extracelular (Martinez and Araújo 2004, Lallier, Miner et al. 2007, Guo, Carter et al. 2011)
- Diferencias en la expresión de integrinas en su superficie celular (Lee and McCulloch 1997, Palaiologou, Yukna et al. 2001, Martinez and Araújo 2004, Guo, Carter et al. 2011, Larjava, Koivisto et al. 2011) y
- Diferente expresión de moléculas citoplásmicas transductoras de señales asociadas a la actividad de las integrinas (Lipson, Wong et al. 2012).

Integrinas en los fibroblastos gingivales

Las integrinas son moléculas proteicas que conforman una superfamilia con al menos 24 diferentes heterodímeros $\alpha\beta$ (Fig. 6), que median la adhesión intercelular, célula-substrato y la unión a receptores.

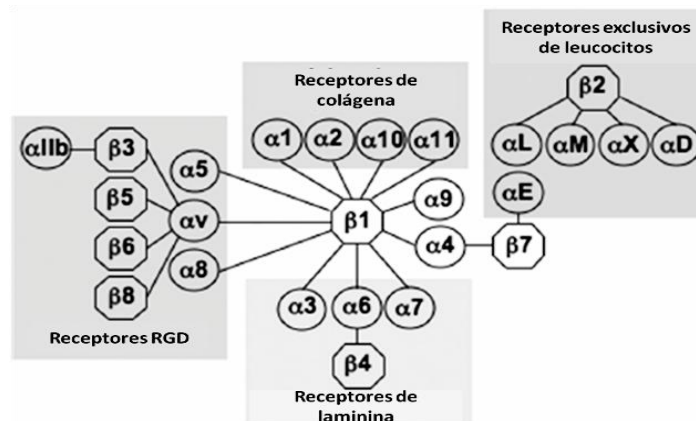


Fig. 6 **Clasificación de los heterodímeros de integrinas** (modificada de (Larjava, Koivisto et al. 2011))

Las integrinas se pueden agrupar en cinco familias, dependiendo de su función, estas familias son: receptores de laminina, receptores de colágena, receptores RGD (Arginina-Glicina-Asparagina), receptores $\alpha 4/\alpha 9$ e integrinas específicas de leucocitos. Los genes de las cadenas α y β están codificados en dos superfamilias de genes separadas y sus productos se asocian de manera no covalente dependiente de cationes. El heterodímero funcionalmente activo presenta una cabeza globular que es el sitio de unión de ligandos y dos colas que se extienden por la membrana hacia el citoplasma (Fig. 7).

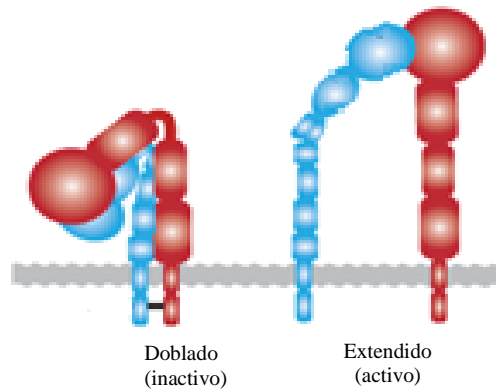


Fig. 7 **Heterodímero de integrina en dos estados conformacionales.** La activación favorece la unión de moléculas como Talina y Kindlina, que separan las colas citoplásmicas y desdoblan la estructura extracitoplásmica para favorecer la exposición de los sitios de unión de ligandos (Bass 2011).

La expresión de moléculas de integrinas en fibroblastos pertenecientes a diferentes tejidos, tienen un patrón particular (Cuadro 1). Estudios cuantitativos en los que se ha detectado de manera individual la cantidad de cada una de las cadenas α o β , permiten calcular diferencias en el número de moléculas pertenecientes a cada heterodímero conocido (Palaiologou, Yukna et al. 2001). Así, en los fibroblastos gingivales, el patrón particular de expresión de integrinas (Cuadro 1) se ha relacionado con las funciones de reparación y cicatrización del periodonto. Se observa una mayor expresión de cadenas $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 8$, αv , $\beta 1$ y $\beta 8$ (Palaiologou, Yukna et al. 2001, Van Der Pauw, Everts et al. 2002, Guo, Carter et al. 2011). Las cadenas de integrinas más expresadas en los fibroblastos gingivales pertenecen a las siguientes familias funcionales de integrinas:

- Receptores de Colágena. Familia formada por heterodímeros $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ y $\alpha 11\beta 1$ interactúan con la colágena, reconociendo la secuencia Gly-Phe-hidroxiPro-Gly-Glu-Arg de la triple hélice de la misma.
- Receptores de Fibronectina y Vitronectina. Integrinas que reconocen ligandos con la secuencia RGD. Los heterodímeros de cadenas $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ y $\alpha v\beta 8$, reconocen la secuencia RGD incluyendo fibronectina, vitronectina, fibrinógeno, factor de von Willebrand, tenascina y osteopontina. La integrina $\alpha 5\beta 1$, representa a los receptores de fibronectina y es un receptor epitelial célula-específico, su expresión es inducida en queratinocitos durante la restauración del epitelio, promueve la adhesión de las células a la fibronectina y la tenascina, estimulando el crecimiento del epitelio por reconocimiento de la región citoplásmica EKxKVDL.
- Receptores de Laminina. Los miembros de esta familia incluyen $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha 7\beta 1$. La integrina $\alpha 3\beta 1$ se expresa en casi todas las células epiteliales y algunas células endoteliales, dentro de hemidesmosomas. $\alpha 6\beta 4$ se asocia con el filamento intermedio

de la queratina en el citoesqueleto y no a la actina, como todas las demás integrinas.

Ligando que reconocen	Integrina	Fibroblastos		
		Gingival	Dérmico	LPD
Fibronectina	$\alpha 4\beta 1$	Moderado	Alto	Moderado
	$\alpha 5\beta 1$	Moderado	Alto	Alto
	$\alpha 8\beta 1$	Alto	Bajo	Moderado
	$\alpha v\beta 1$	Alto	Alto	Alto
	$\alpha v\beta 3$	Moderado	Alto	Bajo
	$\alpha v\beta 6$	Bajo	Ninguno	Bajo
	$\alpha v\beta 8$	Alto	Alto	Bajo
Vitronectina	$\alpha 8\beta 1$	Alto	Bajo	Moderado
	$\alpha v\beta 1$	Alto	Alto	Alto
	$\alpha v\beta 3$	Bajo	Alto	Bajo
	$\alpha v\beta 5$	Alto	Alto	Alto
Laminina	$\alpha 3\beta 1$	Moderado	Bajo	Moderado
	$\alpha 6\beta 1$	Moderado	Moderado	Moderado
	$\alpha 7\beta 1$	Alto	Alto	Alto
	$\alpha v\beta 8$	Alto	Alto	bajo
Colágena	$\alpha 1\beta 1$	Moderado	Moderado	Moderado
	$\alpha 2\beta 1$	Bajo	Moderado	Moderado
	$\alpha 10\beta 1$	Ninguno	Moderado	Moderado
	$\alpha 11\beta 1$	Bajo	Alto	Ninguno
	$\alpha v\beta 8$	Alto	Alto	Bajo
Tenascina	$\alpha 8\beta 1$	Alto	Bajo	Moderado
Osteoportina	$\alpha 8\beta 1$	Alto	Bajo	Moderado

Cuadro 1 **Expresión de heterodímeros de Integrinas probables**, con respecto a la expresión relativa de cada cadena en fibroblastos gingivales, dérmicos y del ligamento periodontal (LPD) (Palaiologou, Yukna et al. 2001).

Agrandamiento gingival inducido por fármacos

El agrandamiento gingival es un padecimiento definido como un aumento exagerado del volumen de las encías cuya etiología y severidad tiene relación con factores diversos, incluyendo genéticos, hormonales, neoplásicos, idiopáticos, bacterianos, de higiene oral, de edad, de género y de administración de fármacos (Diaz Caballero, Arevalo Tovar et al. 2009, Balan, Popescu et al. 2011).

Patológicamente, el agrandamiento gingival comienza en la encía libre (interdental), 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 (Newman, Takei et al. 2010) y no se extiende más allá de la unión mucogingival (Diaz Caballero, Arevalo Tovar et al. 2009).

El agrandamiento gingival se caracteriza por una modificación en la morfología del tejido. Se incrementa el tamaño de las crestas epidérmicas (*rete peg*) (Fig. 8) (Fu, Hsieh et al. 2001, Kantarci, Nseir et al. 2011); se observa una pérdida de la continuidad del tejido de la membrana basal y migración de células del epitelio (Larjava, Salo et al. 1993, Sume, Kantarci et al. 2010, Kantarci, Nseir et al. 2011). También se observa en el tejido conjuntivo la acumulación de proteínas de matriz extracelular, sobre todo colágena (Hyland, Traynor et al. 2003), presencia de células inflamatorias y el incremento en la vascularización.

Con respecto a la cantidad de fibroblastos presentes, los reportes indican diferencias dependientes del origen etiológico del agrandamiento e inclusive hay discrepancias entre los resultados de una misma condición, sobretodo en agrandamientos gingivales inducidos por fármacos (Bulut, Uslu et al. 2006, Diaz Caballero, Arevalo Tovar et al. 2009). Algunos autores consideran padecimientos como la gingivitis o la fibromatosis hialina juvenil (Hakki, Balci et al. 2005, Vieira-Júnior, de Oliveira-Santos et al. 2013) o el agrandamiento inducido por ciclosporina A (Nizemismalman, Vahabi et al. 2003) como enfermedades en las que se presenta un proceso hiperplásico en las encías. Estos datos se contrastan con los presentados por Deliliers y Nurmenniemi, que reportan no encontrar diferencias en el número de células entre controles de individuos o cultivos sanos y las condiciones evaluadas (Deliliers, Santoro et al. 1986; Nurmenniemi, Pernu et al. 2001).

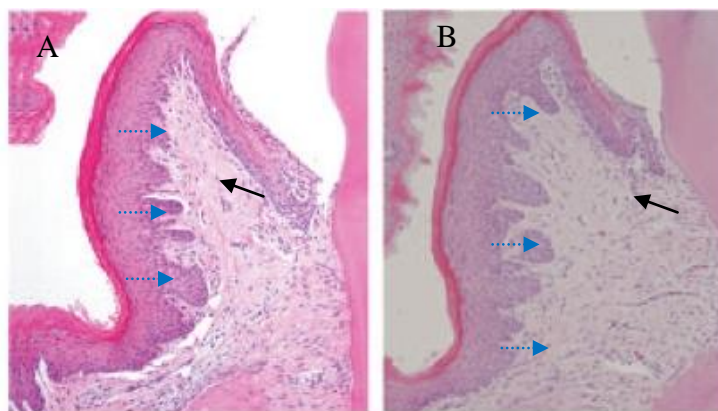


Fig 8. **Microfotografía de un corte histológico de encía murina teñida con HE.** El panel A muestra el corte de una encía normal, a la que se le administró DMS como control de prueba. El panel B representa una encía tratada por seis semanas con nifedipina. Se observa una modificación de la morfología del tejido conjuntivo de la encía por efecto de la administración de nifedipina (flechas negras). La administración de nifedipina ocasiona la modificación de la estructura de la encía, agrandándola y desestabilizando la estructura fronteriza entre el tejido epidérmico y el conjuntivo (*rete peg*) (flechas azules) (Hattori, Nakano et al. 2009).

La identificación clínica del agrandamiento gingival puede realizarse a partir de diferentes parámetros como el hipercrecimiento, la cobertura de la corona dental o la composición del tejido conjuntivo (Bueno Rossy 2001). La severidad de las enfermedades periodontales, suelen evaluarse utilizando un sistema con tres categorías: 1- ligera, 2- moderada y 3-

severa. Entre los clínicos se recomienda clasificarlas con base en la pérdida de adhesión de la encía (entre el esmalte del cemento radicular y la unión con la encía externa), medido con una sonda periodontal, donde ligero corresponde a 1-2 mm, moderado de 3-4 mm y severo \geq 5 mm (Armitage 2004).

Para homogeneizar los criterios, en 1999 la Academia Americana de Periodontología (Larjava, Salo et al.) reclasificó a las enfermedades periodontales según su origen etiológico (Armitage 2004):

- A. Enfermedades gingivales inducidas por placa dental
- B. Lesiones gingivales no inducidas por placa
- C. Enfermedades gingivales de origen fúngico
- D. Lesiones gingivales de origen genético
- E. Manifestaciones gingivales por condiciones sistémicas
- F. Lesiones traumáticas
- G. Reacciones a agentes externos
- H. No especificadas

El agrandamiento gingival, incluido en la categoría de enfermedades gingivales inducidas por placa dental, se identifica como una enfermedad inducida por placa. A pesar de que la placa dentobacteriana puede no ser un factor etiológico del padecimiento, sí lo puede agravar y una correcta higiene bucal, puede favorecer la disminución del infiltrado inflamatorio a las encías (Wiebe and Putnins 2000, Bulut, Uslu et al. 2006, Sousa, Navarro et al. 2011). Este agrandamiento gingival inducido por placa, también denominado periodontitis puede ser resultado de la administración sistémica de ciertos fármacos y fue descrito por primera vez en la administración de fenitoína, por Kimball en 1939. También se ha reportado en la administración de inmunosupresores como la ciclosporina A (Starzl, Weil et al. 1980) y bloqueadores de los canales de calcio, como la nifedipina (Ramon, Behar et al. 1984).

El agrandamiento gingival inducido por fármacos afecta los componentes celulares y extracelulares de los tejidos periodontales, ocasionando cambios histológicos, desregulación del ciclo celular (Nurmenniemi, Pernu et al. 2001, Uzel, Kantarci et al. 2001) e inducción de procesos apoptóticos (Kantarci, Augustin et al. 2007). La magnitud del agrandamiento está directamente relacionada con la medicación, se ha descrito que una disminución de la dosis o interrupción del tratamiento mejora la sintomatología, aún así, en la actualidad su tratamiento clínico está únicamente dado por procedimientos de extracción quirúrgica, gingivectomía y gingivoplastia (Diaz Caballero, Arevalo Tovar et al. 2009, Sume, Kantarci et al. 2010).

En modelos animales, tras la administración oral de fármacos inductores de agrandamientos gingivales en ratas, se ha observado que presentan entre sí características comunes en todos los casos:

1. El agrandamiento es más evidente en el área vestibular que en la lingual o palatina y menos severa en el maxilar superior.
2. La incidencia del padecimiento está relacionada con la concentración sistémica del fármaco y su severidad depende de la concentración sanguínea, siendo el agrandamiento más severo el inducido por ciclosporina A.
3. El agrandamiento se presenta en un periodo cercano a los 40 días post administración del fármaco.
4. El padecimiento cesa y regresa inmediatamente al suprimir la administración del fármaco.
5. La placa dentobacteriana agrava el cuadro sintomático.
6. El sexo, edad y concentración del fármaco afectan el agrandamiento gingival (Bueno Rossy 2001).

Particularmente, en pacientes con agrandamiento inducido por fármacos, se adelgaza el epitelio y se alargan las crestas epidérmicas (*rete peg*) Fig. 9 (Deliliers, Santoro et al. 1986, Fu, Hsieh et al. 2001), existe fibrosis de la *lámina propia* y una proliferación del tejido epitelial, asociado a un incremento de la actividad mitótica (Nurmenniemi, Pernu et al. 2001).

Fármacos promotores del agrandamiento gingival

La nifedipina, la ciclosporina A y la fenitoína, pertenecen a tres familias de fármacos: bloqueadores de los canales de calcio, inmunosupresores y anticonvulsivos, respectivamente; todos responsables de generar como efecto adverso el agrandamiento gingival (Kataoka, Kido et al. 2005).

La nifedipina es un medicamento ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares ya que ejerce un efecto bloqueador de los canales de calcio, reduce así el flujo de calcio al interior de la célula y disminuye el consumo de oxígeno (Nurmenniemi, Pernu et al. 2001). Los inhibidores de canales de calcio, como lo indica su clasificación, inhiben el flujo de calcio y con esto impiden la contracción de las fibras de miocardio. También relajan las fibras del músculo liso especialmente del sistema vascular, lo que favorece el tratamiento de la hipertensión. Además pueden disminuir la activación plaquetaria, la contracción vascular y reducir lesiones ateroscleróticas nuevas, a través de la modificación de los potenciales de calcio intracelular (Balan, Popescu et al. 2011).

La ciclosporina A es un fármaco inmunosupresor, usualmente elegido para prevenir el rechazo de órganos transplantados, así como para tratar enfermedades autoinmunes (Jung, Jeong et al. 2008). Se ha reportado que inhibe la liberación de calcio de los compartimentos intracelulares, incluyendo al retículo endoplásmico y la mitocondria (Smali, Stellato et al. 2001). Estudios inmunológicos han demostrado que la ciclosporina A bloquea la proliferación de los linfocitos T. Esta capacidad reguladora y no citotóxica favoreció desde hace varias décadas su empleo

como fármaco inmunosupresor, sustituyendo a fármacos como la azatioprina, el metrotexato y la ciclofosfamida que reducen el número total de linfocitos circulantes (Resch and Szamel 1997, Cotrim, Martelli-Junior et al. 2003).

La fenitoína inhibe el flujo de sodio al interior de la célula, ejerce un efecto estabilizador sobre las membranas excitables de diversas células, incluyendo neuronas y miocitos cardíacos, reduciendo también la magnitud y la duración de los potenciales dependientes de calcio. Su prescripción médica está señalada en tratamientos de la epilepsia, también en casos de neuralgia y arritmias cardíacas (Dias Corrêa, Martins Queiroz-Junior et al. 2011).

Los mecanismos de acción por los que estos fármacos desencadenan el agrandamiento gingival no están aún claros. Parece existir una relación estrecha entre la desregulación de la homeostasis de la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular, como la colágena, la fibronectina y los glicosaminoglicanos y el aumento en el volumen del tejido conjuntivo (Kataoka, Shimizu et al. 2001).

En México no existen reportes específicos de este padecimiento, aún así estudios epidemiológicos en otros países reportan una amplia variación porcentual entre los pacientes que consumen este tipo de fármacos y la incidencia del agrandamiento gingival (Ellis, Seymour et al. 1999, Miranda, Brunet et al. 2001, Sanz 2012). Para los fármacos bloqueadores de canales de calcio, incluyendo en primer lugar a la nifedipina, se realizó un censo en Países Bajos donde se reporta una incidencia de agrandamiento gingival del 95% (Sanz 2012). En el caso de la ciclosporina A, de los pacientes tratados con este fármaco un rango entre el 25-80% desarrollan este efecto adverso (Bueno Rossy 2001).

La clasificación de los pacientes en dos grupos: pacientes respondedores (responders) y pacientes no respondedores (not responders) ha sido reportado, diferenciando los grupos respecto a la presencia o ausencia de agrandamiento gingival en los pacientes (Fujii, Matsumoto et al. 1994, Takeuchi 2004), y se ha encontrado un vínculo entre el agrandamiento gingival y polimorfismos en los genes *IL-1A* (C/T - 889) y en la posición +807 del gen para integrinas $\alpha 2$. (Ogino, Kido et al. 2005, Bostanci, Ilgenli et al. 2006).

Clínicamente, los agrandamientos gingivales por la administración de fármacos, son similares (Fig. 9), se observan papilas lobuladas por el área vestibular y/o lingual, en ambos maxilares. Histopatológicamente se observa un epitelio hiperplásico así como un aumento de las fibras de colágena (Bueno Rossy 2001).

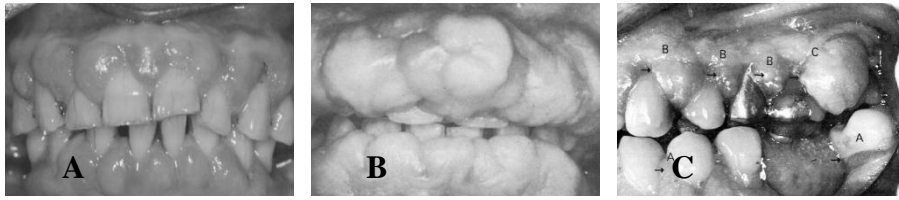


Fig. 9 **Fotografía de tres casos clínicos con agrandamiento gingival inducido por fármacos.** Se observa la apariencia clínica de las encías de pacientes que consumen nifedipina (A), fenitoína (B) y ciclosporina A (C) (Hassell and Gilbert 1983, Pernu, Pernu et al. 1992, Kataoka, Kido et al. 2005)

Nifedipina y fibroblastos gingivales

En 1984 Ramon y cols., reportaron por primera vez el agrandamiento gingival como efecto adverso de la administración sistémica de nifedipina (Ramon, Behar et al. 1984). A partir de entonces, se ha evaluado el efecto del fármaco en el periodonto, sobretodo su efecto en los fibroblastos gingivales. Al parecer el agrandamiento es resultado del efecto de los metabolitos del fármaco y la alteración del metabolismo del calcio, más que por el efecto directo del medicamento (Bueno Rossy 2001).

La inducción del agrandamiento gingival por nifedipina, presenta contradicciones con respecto a su clasificación; mientras algunos reportan que en ensayos *in vitro* se observa un aumento en la velocidad de crecimiento de los fibroblastos gingivales, (Fujii, Matsumoto et al. 1994, Nurmenniemi, Pernu et al. 2001), otros lo catalogan como un incremento en el estroma (Diaz Caballero, Arevalo Tovar et al. 2009) o una reducción de los procesos apoptóticos, inducidos por LPS (Takeuchi 2004). Se ha descrito también, una disminución de funciones celulares como la fagocitosis de fibras de colágena, así como la reducción en la expresión de mRNAs de colágena tipo I y MMP-2 (Kataoka, Shimizu et al. 2001). Se ha evaluado la participación de citocinas pro-inflamatorias como promotores del proceso inflamatorio (Takeuchi 2004, Sakagami, Sato et al. 2006, Sato and Fujii 2008).

Dentro de los efectos que generan los fármacos bloqueadores de canales de calcio, como la Nifedipina, se encuentran:

- a) La interrupción en la inhibición de la acción de la colágeno sintetasa.
- b) Remodelamiento de la membrana basal y activación de las MMPs - 2, 8, 9 y 13, encargadas de la degradación del colágena tipo IV (Sakagami, Sato et al. 2006).
- c) Conservación de la expresión del receptor de integrinas $\alpha\beta6$ (Sume, Kantarci et al. 2010).

Ciclosporina A y fibroblastos gingivales

Los agrandamientos gingivales inducidos por ciclosporina A han adquirido una gran relevancia ya que por su uso farmacéutico (inmunosupresor en transplantes de órganos), este compuesto se

administra a un rango de población muy amplio (Nazemisalman, Vahabi et al. 2013) y su sustitución o suspensión, no es factible en la mayoría de los casos.

Los efectos sobre procesos relacionados con el crecimiento y la muerte celular tienden a describir a la ciclosporina A como un agente que no sólo aumenta el número de fibroblastos gingivales en ensayos *in vitro* (Nazemisalman, Vahabi et al. 2013), sino que además disminuye la expresión de moléculas involucradas en la apoptosis de los mismos (Delilliers, Santoro et al. 1986, Kantarci, Augustin et al. 2007). Algunos autores sugieren que con la ciclosporina A existe un proceso hiperplásico acompañado de la acumulación de fibras de colágena (Kataoka, Shimizu et al. 2000), mostrándose éstas como fibras hialinizadas, ocasionado por la disminución de la degradación de la colágena tipo I (Kataoka, Shimizu et al. 2000).

La influencia de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento como el TFG- β 1 (Nazemisalman, Vahabi et al. 2013) y la modificación en el nivel de expresión de integrinas α 2 en la superficie celular (Kataoka, Seto et al. 2003), parecen tener influencia en el proceso de agrandamiento gingival. No así de la diferenciación de los fibroblastos por la expresión de α -SMA (α -Smooth Muscle Actin, por sus siglas en inglés) (Sobral, Kellermann et al. 2010, Sobral, Aseredo et al. 2012) o moléculas como SMAD-7 (Sobral, Aseredo et al. 2012).

Al parecer la ciclosporina A actúa inhibiendo la síntesis de IL-1 en los queratinocitos activos, lo que estimula la proliferación y actividad sintética de los fibroblastos. La IL-2 es responsable de la actividad de enzimas colagenolíticas favoreciendo el agrandamiento gingival (Bueno Rossy 2001).

En el agrandamiento gingival inducido por fármacos, provocado por la administración de ciclosporina A, la encía es de color rosa, se observa resiliente y densa, su superficie es granular o punteada, con poca tendencia a la hemorragia y con lobulaciones (Fig. 10). Los estudios de histopatología revelan alteraciones epitelio-conectivas, observando el aumento de la matriz de colágena y engrosamiento epitelial, se han evidenciado zonas de tejido de granulación asociado a placa microbiana. Se observa acantosis, vacuolización de células de superficie del estrato espinoso, el tejido conjuntivo subyacente presenta zonas adematosas con aumento de la sustancia fundamental, vasodilatación, mayor número de fibroblastos y proliferación de fibras de colágena en diferentes direcciones (Bueno Rossy 2001).

HIPÓTESIS

El crecimiento gingival en pacientes bajo tratamiento con nifedipina o ciclosporina A, involucra un incremento en la tasa de duplicación celular de los fibroblastos gingivales, así como una modificación en la expresión de integrinas en su superficie celular.

OBJETIVOS

General

Caracterizar el crecimiento celular y la expresión de integrinas en fibroblastos humanos derivados de agrandamientos gingivales inducidos por Nifedipina y Ciclosporina A.

Particulares

- Determinar la velocidad de crecimiento de los fibroblastos aislados.
- Comparar la expresión de integrinas en fibroblastos de individuos sanos y en fibroblastos de pacientes con agrandamiento gingival bajo tratamiento con nifedipina o ciclosporina A.
- Comparar la adhesión de fibroblastos gingivales a proteínas de matriz extracelular de individuos sanos y en fibroblastos de pacientes con agrandamiento gingival bajo tratamiento con nifedipina o ciclosporina A.
- Evaluar en ensayos de adhesión, la participación de diferentes subunidades de integrinas en este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Se utilizan líneas celulares de fibroblastos gingivales donados por la Dra. Eileen Uribe del posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, provenientes de cultivos primarios de fibroblastos aislados de pacientes odontológicos con agrandamiento gingival por tratamiento farmacológico con nifedipina o ciclosporina A y de individuos sanos. Los fibroblastos son mantenidos en medio DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY), suplementado con 10 % suero fetal bovino, 20 mM L-Glutamina, 50,000 unidades de penicilina, 50,000 unidades de estreptomincina y 125 µg de amfotericina B, atemperado a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los estudios realizados se llevaron acabo entre los pases 4 y 12 de los cultivos.

Materiales

Los siguientes anticuerpos son utilizados: anticuerpo monoclonal (mAb) P1E6 contra integrina α₂ (número de catálogo ab24697), mAb P1B5 contra integrina α₃ (ab24696), mAb P4G9 contra integrina α₄ (ab78453), mAb P1D6 contra integrina α₅ (ab75472), mAb VNR 147 contra integrina α_v (ab78289j) y mAb AP3 contra integrina β₃ (ab115234) de ABcam; mAb TS2/16 contra integrina β₁ (sc-53711), mAb W6/32 contra moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (sc-32235), fragmento F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra IgG de ratón, acoplados a isotiocianato de fluoresceina (sc-3699) de Santa Cruz Biotechnology; mAb 15/7 contra integrina β₁ activada (. Todos los demás reactivos fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Tratamiento de las células para realizar ensayos

De cultivos en confluencia, provenientes de los cultivos primarios de cada grupo de estudio, se subcultivan las células despegándolas con 1 ml de tripsina (0.1%) por 15 segundos, se inactiva la tripsina con la adición de 3 ml de medio DMEM, se centrifugan a 1200 rpm por 1 min, se retira el sobrenadante y el botón celular se resuspende en a la concentración celular necesaria dependiendo del ensayo a realizar.

Velocidad de crecimiento

Los fibroblastos gingivales provenientes de individuos sanos y derivados de pacientes que consumen nifedipina o ciclosporina A, se suspenden en medio DMEM a una concentración de 3 x10⁴ células por ml, en una caja de cultivo con 96 pozos se siembran 100 µl de la suspensión en cada uno, conteniendo 3 x10³ células. Se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Cada 24 horas, las células de 4 pozos se fijan por 15 minutos con glutaraldehído 1 % en PBS, al finalizar los días

de evaluación, se tiñen los pozos por 30 minutos con 50 μ l/pozo de cristal violeta al 0.5% en metanol al 20% en PBS, se lavan los pozos con agua destilada y se disuelve el colorante por 1 hora con SDS al 1 % (Kueng, Silber et al. 1989). Inmediatamente después, se lee la absorbancia de las muestras en un lector de placas (Synergy HT, Bio-Tek) a 590 nm.

Tiempo de duplicación

Para realizar la curva estándar de crecimiento, los fibroblastos gingivales de individuos sanos se suspenden en medio DMEM a una concentración inicial de 6×10^5 células por ml, en una caja de cultivo con 96 pozos se siembran por cuatuplicado diferentes volúmenes de la suspensión celular: 100 μ l, 75 μ l, 50 μ l, 25 μ l y 5 μ l, conteniendo 6×10^4 , 4.5×10^4 , 3×10^4 , 1.5×10^4 y 3×10^3 células, respectivamente. Se aforan con medio de cultivo DMEM a 100 μ l por pozo y se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ por 4 horas, las células se fijan y tiñen con el mismo procedimiento que en las curvas de crecimiento.

La correlación de datos se realiza considerando las absorbancias que coincidan con la fase de crecimiento exponencial de los cultivos estudiados ($A_1=1.314$, correspondiente a 1×10^4 células y $A_2= 2.623$, correspondiente a 2×10^4 células); el promedio de absorbancia considerado para cada punto en la gráfica de velocidad de crecimiento, es interpolado con los datos de absorbancia obtenidos en la curva estándar, obteniendo así el tiempo en el que cada línea celular se duplica dentro de la fase *log* de crecimiento,

Tinción para citimetría de flujo

Las alícuotas de los fibroblastos (1×10^6) de cultivos controles y con tratamiento farmacológico son marcadas con cada uno de los anticuerpos monoclonales para integrinas, a una concentración final de 10 μ g/ml, se incuban en hielo por 1 hora y se lavan tres veces con 1000 μ l de buffer para FACS frío (PBS + 0.5 % Albúmina de suero bobino (BSA) + 1 % Sucrosa); se tiñen con el anticuerpo F(ab')₂ cabra anti-ratón IgG conjugado con FITC (1/400), incubando en hielo por 30 min, se vuelven a lavar tres veces con 1000 μ l de Buffer para FACS frío, en todos los casos controles negativos y positivos, marcadas sólo con el anticuerpo secundario (FITC conjugated F(ab')₂ cabra anti-ratón IgG conjugado con FITC) o con el anticuerpo primario W6/32 (anti MHC clase I) y FITC respectivamente fueron realizados. Inmediatamente después se retira el sobrenadante y los botones de células se fijan agregándoles 300 μ l de buffer de fijación (1% de paraformaldehído en PBS frío). Se almacenan protegidos de la luz a 4 °C para su posterior lectura en el citómetro de flujo.

Análisis en el citómetro de flujo

Los fibroblastos teñidos y fijados se leen en el citómetro de flujo FACScan. Los parámetros de adquisición utilizados fueron: FSC en escala

logarítmica 10^{-1} , SSC en escala logarítmica con un voltaje de 245 v. En el barrido de células que se observa en el gráfico de puntos (dot plot), se selecciona la población perteneciente a los fibroblastos gingivales (Fig. 10), se contabilizan 10,000 eventos por muestra, los fibroblastos teñidos con el anticuerpo secundario FITC, son detectadas por el laser FL-1 (506 nm) en escala logarítmica con un voltaje dependiente del cultivo evaluado (Con-001: 430 v, Con-002: de 420-450 v, Nif-001 y Nif-002: de 410 - 460v, CsA-001: de 410- 460 v). Las lecturas obtenidas se grafican en histogramas comparando la cantidad de fluorescencia obtenida contra el número de células. El análisis de datos se realizó con el software CellQuest (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ).

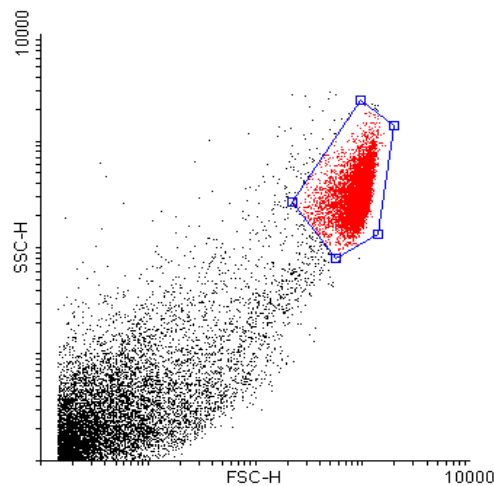


Fig. 10 **Dot plot de fibroblastos gingivales.** Detección de los fibroblastos teñidos únicamente con el anticuerpo secundario FITC, con un voltaje de 420 v. En rojo se muestra el área donde se localizan los fibroblastos gingivales, el demás barrido corresponde a trozos de células y matriz extracelular colectados en la misma muestra.

Ensayos de adhesión

Los fibroblastos gingivales provenientes de individuos sanos y derivados de pacientes que consumen nifedipina o ciclosporina A se colocan en placas para ELISA de 96 pozos poniendo alícuotas de 50 μ l de colágena (Colágena tipo I de cola de rata, Millipore Cat. No. 92590) (10 μ g/ml) o fibronectina (Fibronectina de plasma humano, Roche Cat. No. 11080938001) (10 μ g/ml) o 1% de BSA en solución de NaHCO_3 0.1 M en PBS estéril y se incuban por 12 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se retiran las diluciones de las matrices extracelulares, se lava la placa con 100 μ l por pozo de PBS y se bloquean por dos horas a temperatura ambiente con 300 μ l por pozo de 1% de BSA en PBS.

Se siembran 1×10^4 células por pozo en solución de BSA (1% de BSA en PBS) y se incuban por dos horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Posterior a la incubación se lavan cuidadosamente los pozos con 100 μ l por pozo de PBS y se continúa con el mismo proceso de fijación y tinción utilizado en las determinaciones de las curvas de crecimiento.

Bloqueo de integrinas en ensayos de adhesión

Los fibroblastos gingivales provenientes de individuos sanos y derivados de pacientes que consumen nifedipina o ciclosporina A en un procedimiento prácticamente igual al utilizado en los ensayos de adhesión. En placas de ELISA cubiertas con fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$) los fibroblastos gingivales (1×10^4 células por pozo) se siembran adicionando de manera individual cada uno de los anticuerpos monoclonales para integrinas utilizados en las inmunotinciones, con una concentración final de 1/500 de líquido de ascitis o 100 $\mu\text{g/ml}$, según corresponda.

Análisis estadístico

En cada caso se obtiene el promedio de los ensayos realizados, así como la desviación y el error estándar de los mismos. El análisis estadístico de los resultados se lleva a cabo a través de la prueba de *t de Student*, con el programa Kaleida Graph (Version 3.6.2, Synergy Software).

RESULTADOS

LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES DERIVADOS DE PACIENTES CON TRATAMIENTOS DE NIFEDIPINA O CICLOSPORINA A CRECEN MENOS QUE LOS DE INDIVIDUOS SANOS.

Se evaluó de manera indirecta, por tinción colorimétrica, el crecimiento de los cultivos de fibroblastos gingivales derivados de individuos sanos y de pacientes que consumen nifedipina o ciclosporina A, las lecturas de densidad óptica, medida como absorbancia a 590 nm se promediaron y graficaron (Fig. 11). La absorbancia resultante de la tinción de los fibroblastos corresponde al número de células contenidas en cada uno de los pozos, el promedio de cinco ensayos independientes, realizados entre los pases cinco y nueve, muestran un crecimiento diferenciado entre las tres condiciones estudiadas.

Como lo muestra la figura 11, a partir del día tres las células inician la fase log de crecimiento y a partir de ese punto es evidente una menor absorbancia en los cultivos de células provenientes de tratamientos con cualquiera de los fármacos, lo que se implica una reducción en la velocidad de crecimiento para los cultivos Nif-001 y Nif-002 y para los cultivos de CsA-001, comparada con cualquiera de los cultivos control.

EL TIEMPO DE DUPLICACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES DE INDIVIDUOS SANOS ES AL MENOS 50% MENOR AL DE LOS FIBROBLASTOS DE NIFEDIPINA O CICLOSPORINA A.

Los resultados muestran un comportamiento similar entre los cultivos pertenecientes a una misma condición (Cuadro 2); los fibroblastos de individuos clínicamente sanos, tienen un periodo de duplicación de poco más de dos días, los fibroblastos Nif-001 y Nif-002 incrementan este tiempo prácticamente un 50% y el tiempo de duplicación para CsA-001 es casi del doble, en comparación con las líneas control.

Línea Celular	Tiempo inicial (1 x10 ⁴ células)	Tiempo final (2 x10 ⁴ células)	ΔT
Con-001	3.9 días	6.6 días	2.7 días
Con-002	4.2 días	6.6 días	2.4 días
Nif-001	5.0 días	8.6 días	3.6 días
Nif-002	5.5 días	8.5 días	3.0 días
CsA-001	5.4 días	10.3 días	4.9 días

Cuadro 2. **Tiempo de duplicación de los fibroblastos gingivales.** Resultados de la interpolación del tiempo correspondiente a las absorbancias obtenidas en la fase log de crecimiento. Tiempo inicial (1 x10⁴ células, A=1.314), Tiempo final (2 x10⁴ células, A=2.623).

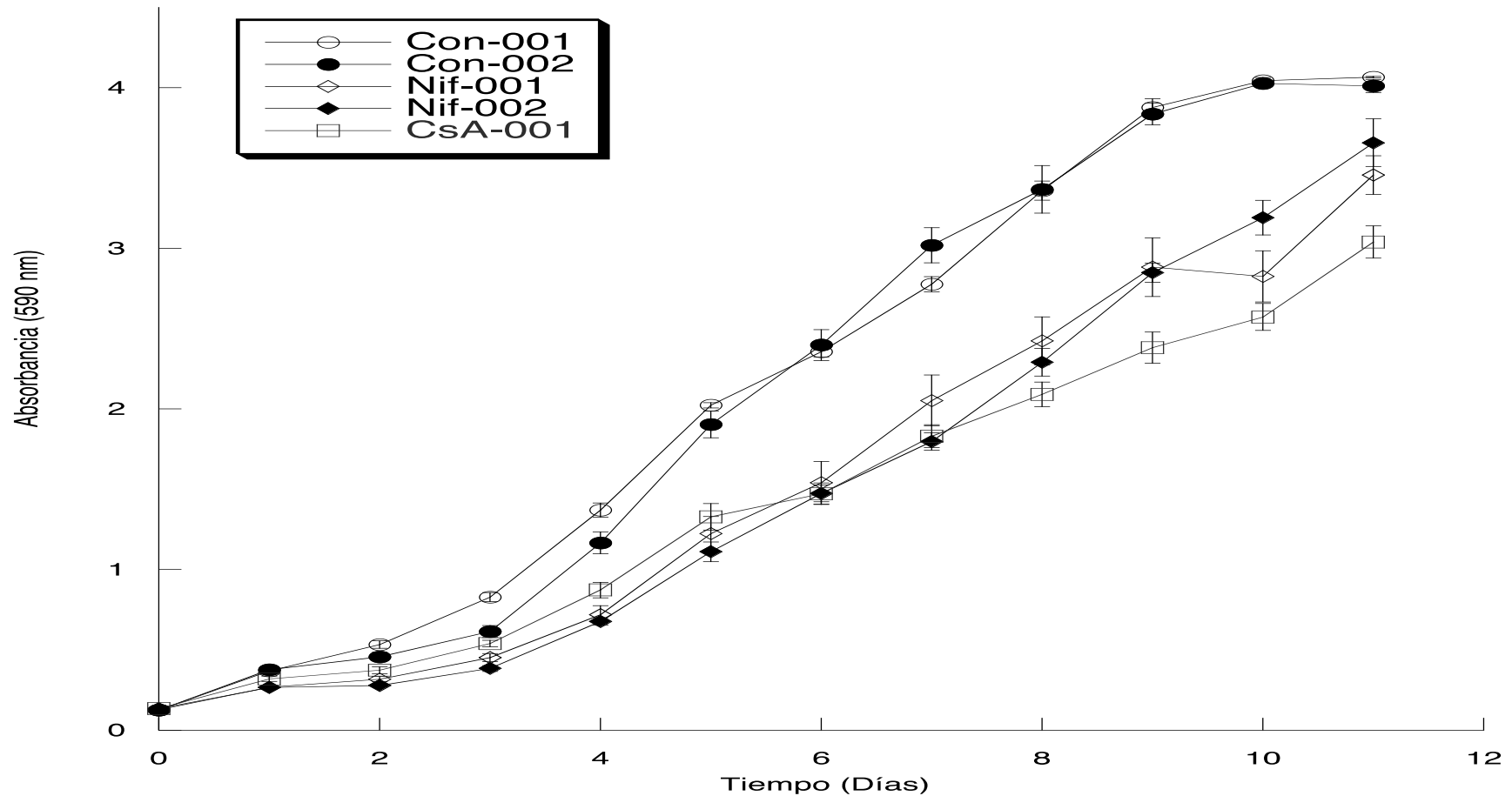


Fig.11 **Crecimiento de fibroblastos gingivales evaluado por tinción colorimétrica.** 3×10^3 células/pozo crecieron en un periodo de 11 días, después de su tinción con cristal violeta, se leyó la absorbancia a 590 nm. La absorbancia obtenida con los fibroblastos de pacientes tratados con nifedipina (Nif-001 y Nif-002) y ciclosporina (CsA-001) es menos si se compara con la absorbancia obtenida con los fibroblastos de individuos sanos (Con-001 y Con-002). Las barras representan el error estándar de los valores promedio de cada cultivo (n=20). Hay una significancia estadística, $P \geq 0.001$, correspondiente a los valores promedio de Nif-001 y Nif-002, a partir del día 2 y CsA-001 a partir del día 3, comparados con los valores de los cultivos control. Clave: o (Con-001), • (Con-002), ◇ (Nif-001), ◆ (Nif-002), □ (CsA-001).

LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES DERIVADOS DE AGRANDAMIENTOS GINGIVALES POR FÁRMACOS, NO EXPRESAN LAS MISMAS INTEGRINAS QUE LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES DE INDIVIDUOS SANOS.

Las detecciones de integrinas por medio de citometría de flujo, muestran que las dos líneas de fibroblastos control expresan las cadenas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ (activada) y $\beta 3$ (Fig.13), La ausencia de cadenas $\alpha 4$ y αv es contrario de los reportes encontrados (Palaiologou, Yukna et al. 2001).

En el caso de Nif-001 el patrón de expresión de integrinas es muy similar al de los grupos control (Fig. 13 y 14), se conserva la expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ (activada) y $\beta 3$, no se detecta la presencia de $\alpha 4$, αv . Las cadenas $\alpha 5$ no se detectadas, siendo este resultado la única diferencia con los cultivos controles. Las integrinas $\alpha 5$ están relacionadas con la adhesión a fibronectina, más que a colágena (Krissansen and Danen 2007). Para el cultivo Nif-002, las condiciones de expresión son prácticamente iguales a las evaluadas en Nif-001. Se observan las cadenas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ y $\beta 3$, y no se detectan las cadenas $\alpha 4$, $\alpha 5$ y αv (Fig.14).

En las células provenientes de tratamiento con Ciclosporina A, de las cadenas de integrinas evaluadas comparadas con los cultivos control, se observa la conservación de la expresión de $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ y no expresan las cadenas $\alpha 4$, αv y $\beta 3$ (Fig. 13 y 15), la ausencia de la integrina $\beta 3$ marca una diferencia fenotípica entre los demás cultivos evaluados y esta línea celular.

Con los fibroblastos gingivales, en ningún caso se detectaron las cadenas $\beta 1$ a partir de su evaluación con el anticuerpo monoclonal TS2/16 que detecta a la integrina en su estado no activado y se confirmó la funcionalidad del anticuerpo a partir de la detección con neutrófilos PMN extraídos de sangre periférica (Fig.12), pero sí se detectó a partir del anticuerpo para integrinas $\beta 1$ activadas 15/7 (Fig. 13, 14 y 15). condición que puede estar relacionada con el epítipo que cada uno de los anticuerpos reconoce.

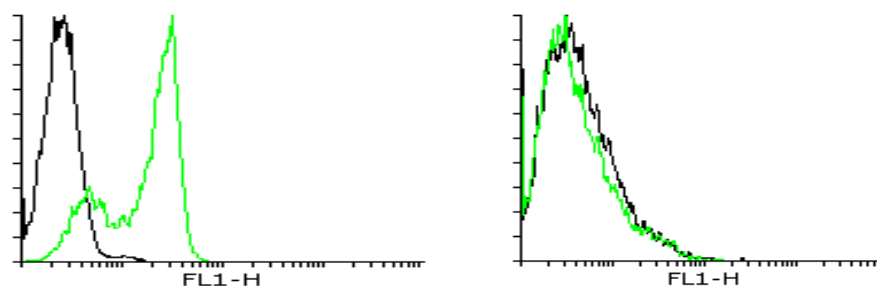


Fig. 12 **Expresión de integrinas $\beta 1$ teñidas con el anticuerpo TS2/16.** El gráfico de la izquierda muestra la detección de integrinas $\beta 1$ en neutrófilos aislados de sangre periférica, el gráfico a la derecha muestra la detección de la misma integrina en fibroblastos gingivales Con-002. En cada caso la línea negra representa la unión no específica del anticuerpo secundario, como blanco y la línea en color a los fibroblastos que detectan la integrina específica. El desplazamiento del histograma hacia la derecha implica una mayor fluorescencia, relacionada con la presencia de la molécula, mientras más alejado del origen, representa una mayor expresión de la molécula detectada.

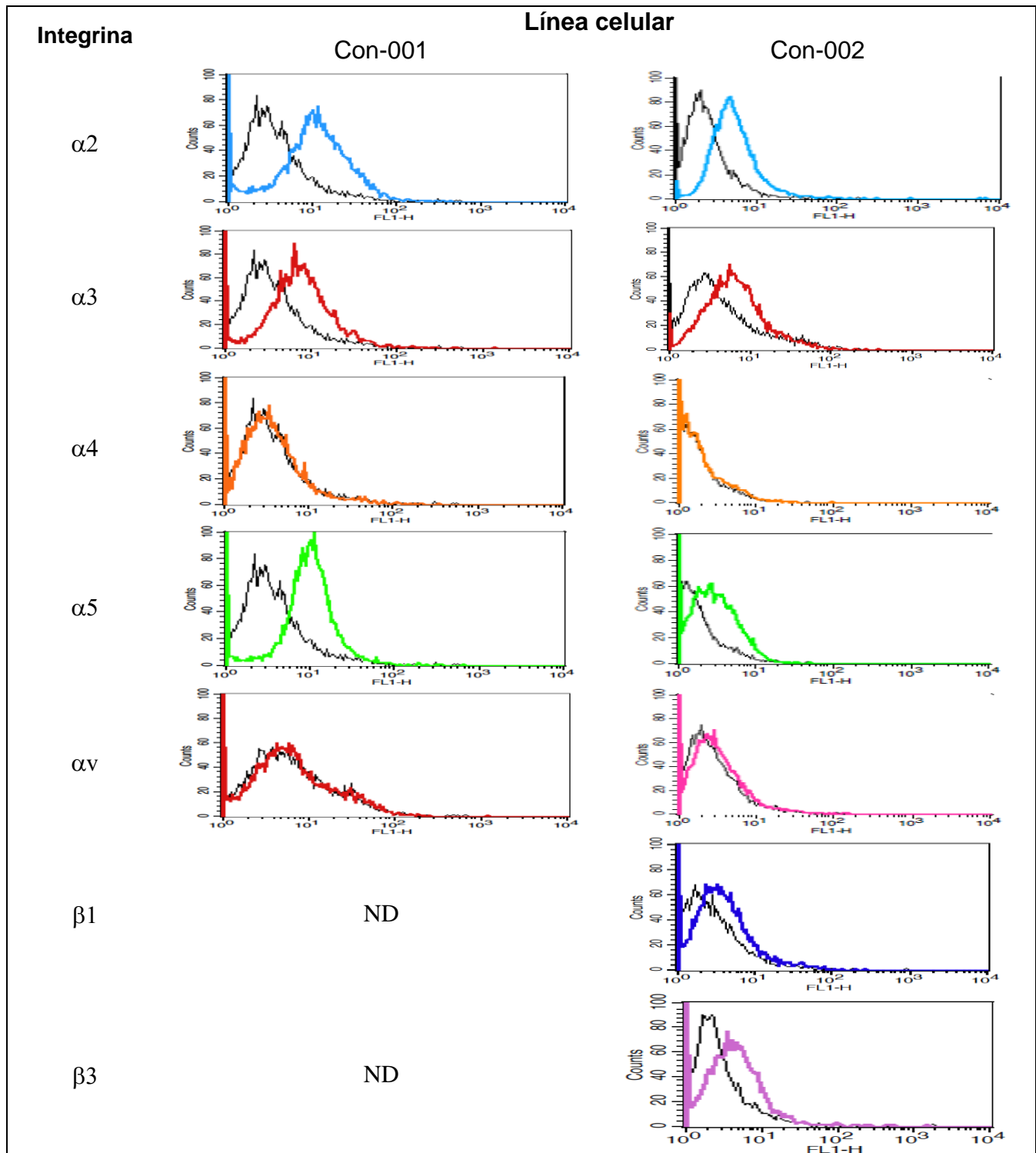


Fig 13. **Expresión de las integrinas en la superficie celular de los fibroblastos control (Con-001 y Con-002).** Cada histograma es representativo de los ensayos realizados (n=3), donde la línea negra representa la unión no específica del anticuerpo secundario, como blanco y la línea en color a los fibroblastos que detectan la integrina específica. El desplazamiento del histograma hacia la derecha implica una mayor fluorescencia, relacionada con la presencia de la molécula, mientras más alejado del origen, representa una mayor expresión de la molécula detectada.

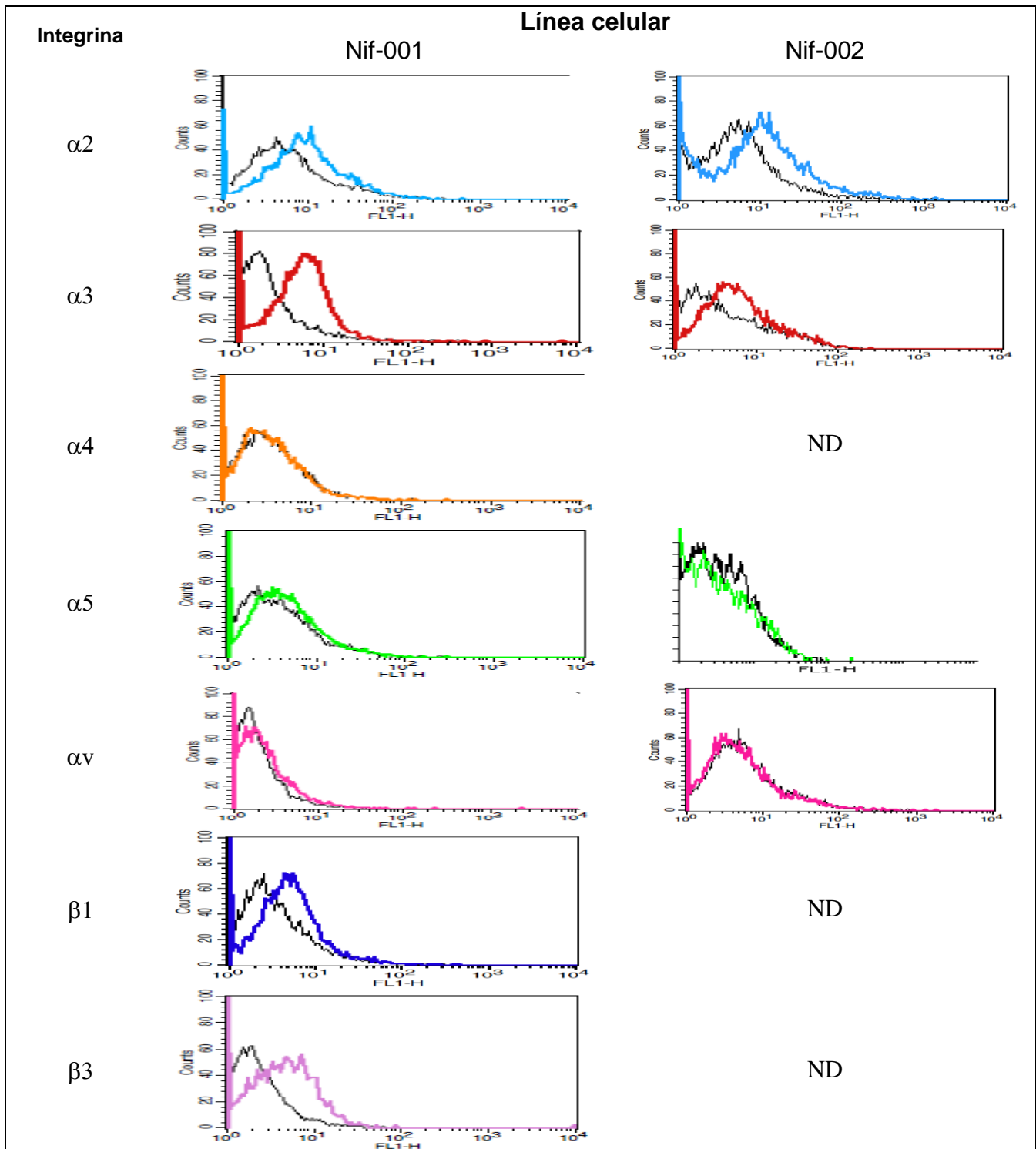


Fig 14. **Expresión de las integrinas en la superficie celular de los fibroblastos derivados de tratamiento con nifedipina (Nif-001 y Nif-002).** Cada histograma es representativo de los ensayos realizados (n=3), donde la línea negra representa la unión no específica del anticuerpo secundario, como blanco y la línea en color a los fibroblastos que detectan la integrina específica. El desplazamiento del histograma hacia la derecha implica una mayor fluorescencia, relacionada con la presencia de la molécula, mientras más alejado del origen, representa una mayor expresión de la molécula detectada.

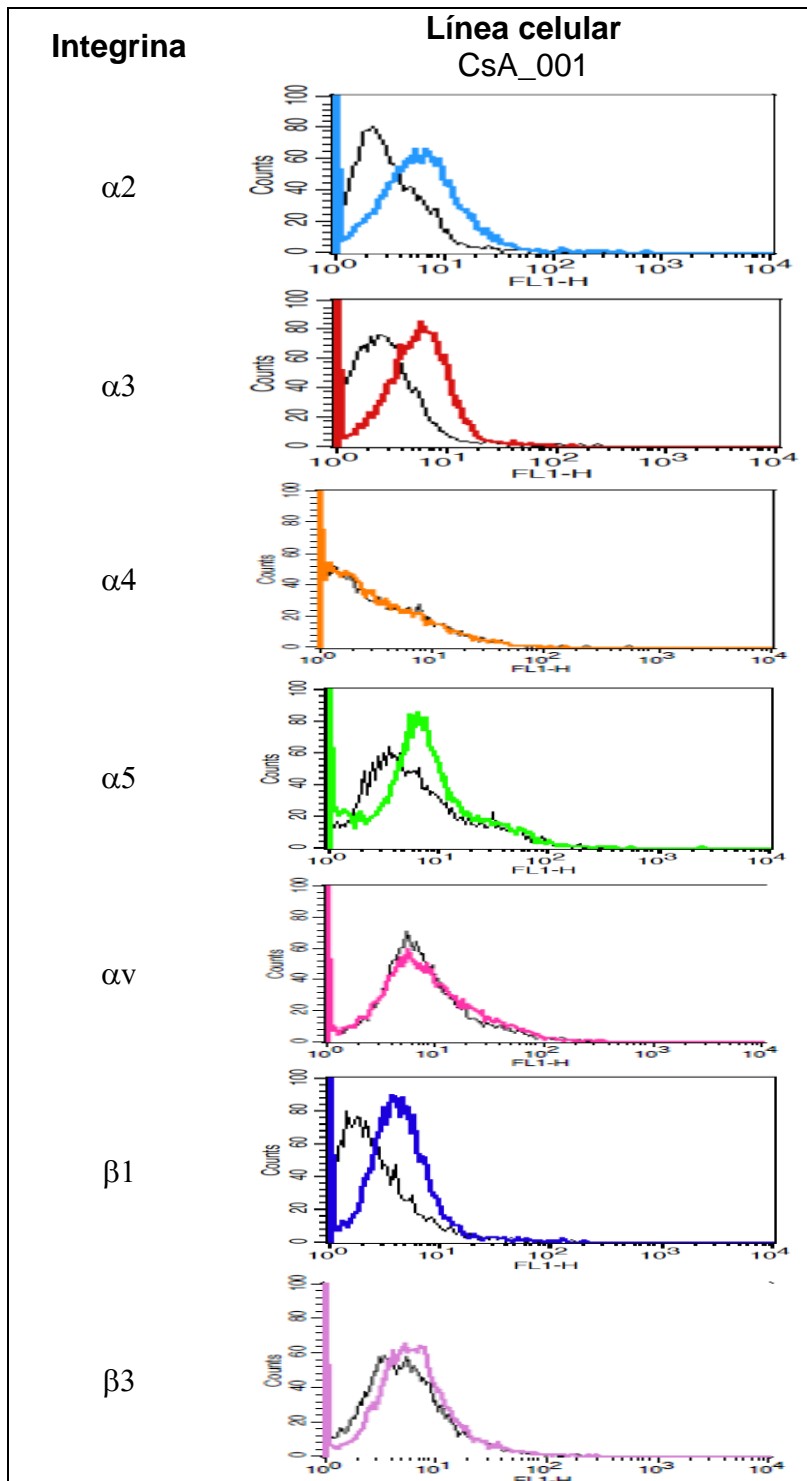


Fig 15. **Expresión de las integrinas en la superficie celular de los fibroblastos derivados de tratamiento con ciclosporina A (CsA-001).** Cada histograma es representativo de los ensayos realizados (n=3), donde la línea negra representa la unión no específica del anticuerpo secundario, como blanco y la línea en color a los fibroblastos que detectan la integrina específica. El desplazamiento del histograma hacia la derecha implica una mayor fluorescencia, relacionada con la presencia de la molécula, mientras más alejado del origen, representa una mayor expresión de la molécula detectada.

En el cuadro 3, pueden observarse de manera sintética los resultados obtenidos en la citometría. Es claro que entre las cinco líneas de fibroblastos gingivales evaluadas, no hay diferencias en la expresión de integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 1$, que coinciden con las cadenas de integrinas reportadas para esta población celular (Guo, Carter et al. 2011).

Integrina/anticuerpo utilizado	Con-001	Con-002	Nif-001	Nif-002	CsA-001
$\alpha 2$ (P1E6)	+	+	+	+	+
$\alpha 3$ (P1B5)	+	+	+	+	+
$\alpha 4$ (P4G9)	-	-	-	ND	-
$\alpha 5$ (P1D6)	+	+	-	-	+
αv (VNR 147)	-	-	-	-	-
$\beta 1$ (TS2/16)	-	-	-	ND	ND
$\beta 1$ (15/7)	ND	+	+	ND	+
$\beta 3$ (AP3)	ND	+	+	ND	+
MHC I (W6/32)	+	+	+	+	+

Cuadro 3. **Consenso de mediciones realizadas para la detección de integrinas en la superficie celular de los fibroblastos gingivales.** Las citometrías, realizadas por triplicado exhiben el siguiente patrón de expresión. + presencia de la integrina en los ensayos de citometría, - ausencia de la integrina en los ensayos; ND ensayos no realizados.

A la par de cada evaluación, a manera de control positivo de expresión las muestras se tiñeron con el anticuerpo W6/32 que detecta al complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC I) (Fig. 16).

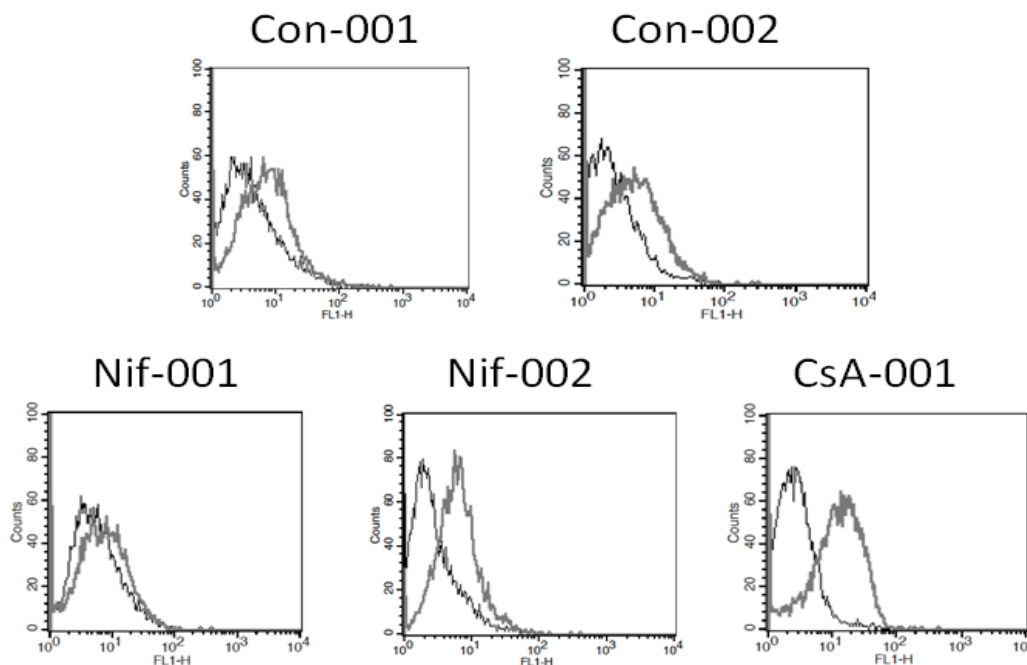


Fig. 16 **Controles positivos del análisis citométrico.** Detección del Complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC I) con el anticuerpo W6/32 en fibroblastos gingivales.

LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES DERIVADOS DE PACIENTES CON TRATAMIENTOS DE NIFEDIPINA SE ADHIEREN 2.5 VECES MÁS A FIBRONECTINA QUE LOS DEMÁS FIBROBLASTOS.

En la evaluación de la capacidad de adhesión a proteínas de matriz extracelular se observa una adhesión diferenciada a la fibronectina y no adhesión a la colágena en todas las líneas de fibroblastos gingivales evaluadas. El cultivo derivado de ciclosporina A se adhiere prácticamente igual a los cultivos control y los provenientes de nifedipina presentan una adhesión aproximadamente 2.5 veces mayor que los cultivos control o el de ciclosporina A (Fig. 17).

Al encontrar que los fibroblastos no se adherían a la colágena primeramente utilizada (Rat tail collagen type I), se repitieron los ensayos utilizando también colágena de cerdo (Porcine collagen type I), obteniendo resultados prácticamente idénticos y sin significancia estadística, a excepción de la línea celular Nif-002 que se adhiere a colágena de cerdo ($P < 0.0001$) (Fig. 18).

LAS INTEGRINAS $\alpha 5$ BLOQUEAN LA ADHESIÓN DE LOS FIBROBLASTOS GINGIVALES A FIBRONECTINA.

La participación de las integrinas en el proceso de adhesión a la fibronectina fue evaluado bloqueando de manera selectiva diferentes cadenas de las integrinas. Los resultados muestran una tendencia en general (Fig. 19), donde las integrinas $\alpha 2$ no están involucradas en la adhesión en ninguno de los cultivos evaluados:

- $\alpha 3$ participa en la adhesión de Con-001 ($P = 0.003$) y Nif-002 ($P = 0.0001$)
- $\alpha 4$ en Con-001 ($P = 0.0015$) y Con-002 ($P = 0.004$)
- αv con las líneas Con-002 ($P < 0,0001$), Nif-001 ($P = 0.003$) y CsA-001 ($P = 0.0002$)
- $\gamma \beta 3$ participa en la adhesión de Con-002 y Nif-002 ($P < 0.0001$ para ambos).

En todos los cultivos de fibroblastos gingivales evaluados, la adhesión a fibronectina, que corresponde a los datos experimentales obtenidos en los ensayos de adhesión (Fig. 17), es bloqueada en gran medida por las integrinas $\alpha 5$ (Fig. 20). Se observa la participación de $\alpha 4$, integrina no detectada en ninguno de los análisis citométricos (Fig. 19), así como el efecto inhibitorio de $\alpha 5$ en el cultivo Nif-001, que tampoco se encontró por medio de la inmunotinción (Fig. 14), estos resultados no eran esperados, pero hacen evidente no sólo la presencia de este tipo de integrinas ($\alpha 4$ y $\alpha 5$, receptores canónicos de fibronectina), sino dan cuenta de su funcionalidad y participación en la adhesión de los fibroblastos a fibronectina.

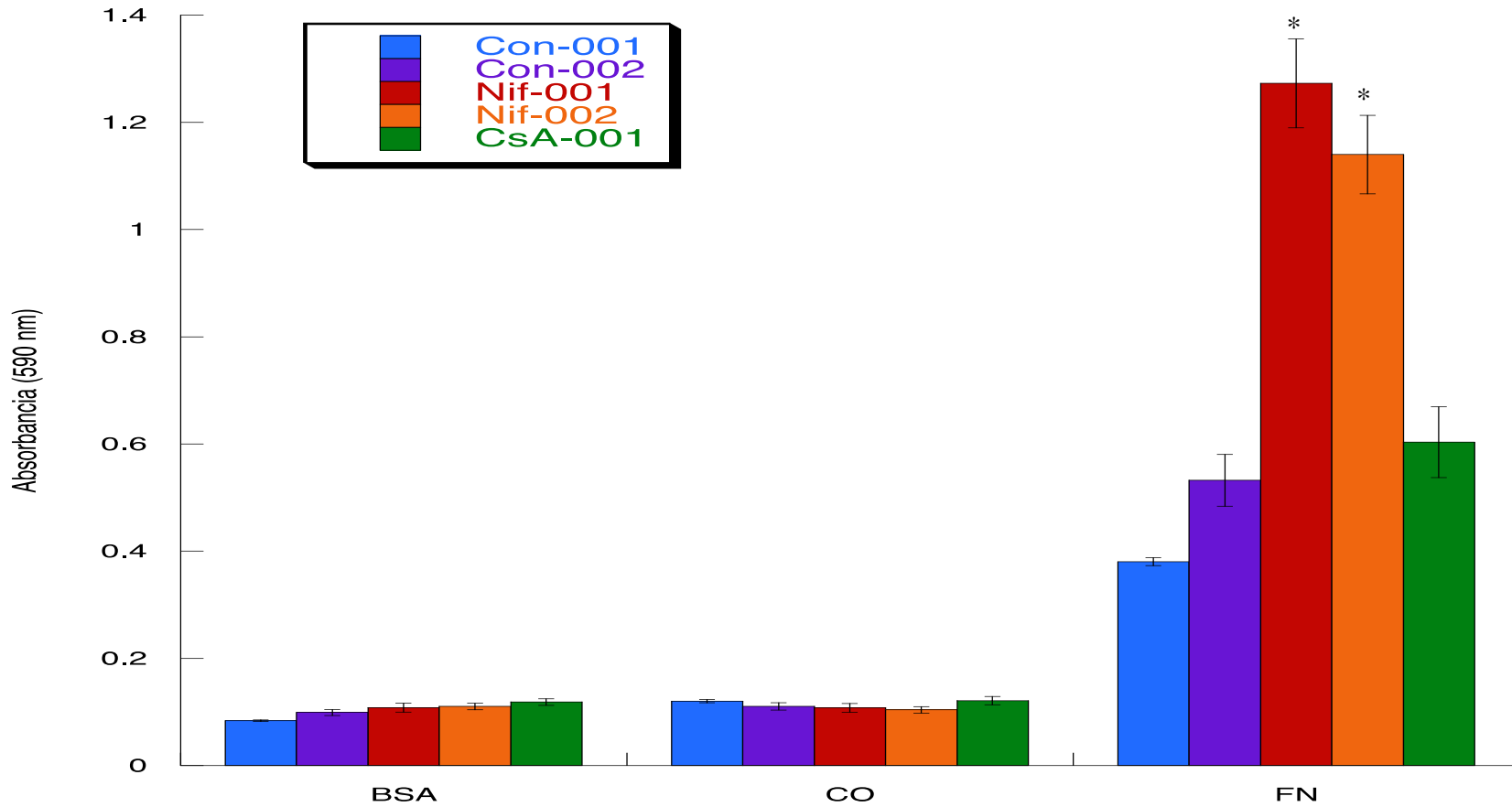


Fig. 17 **Adhesión de fibroblastos gingivales a diferentes Proteínas de Matriz Extracelular (ECM).** La gráfica representa el promedio de seis ensayos independientes (n=36). Las barras de error representan el error estándar de la muestra, la significancia estadística es calculada con la prueba de *t de Student* (* P < 0.0001). BSA, Albúmina de suero bovino como control negativo de adhesión; CO, Colágena tipo I de rata; FN, fibronectina de plasma humano.

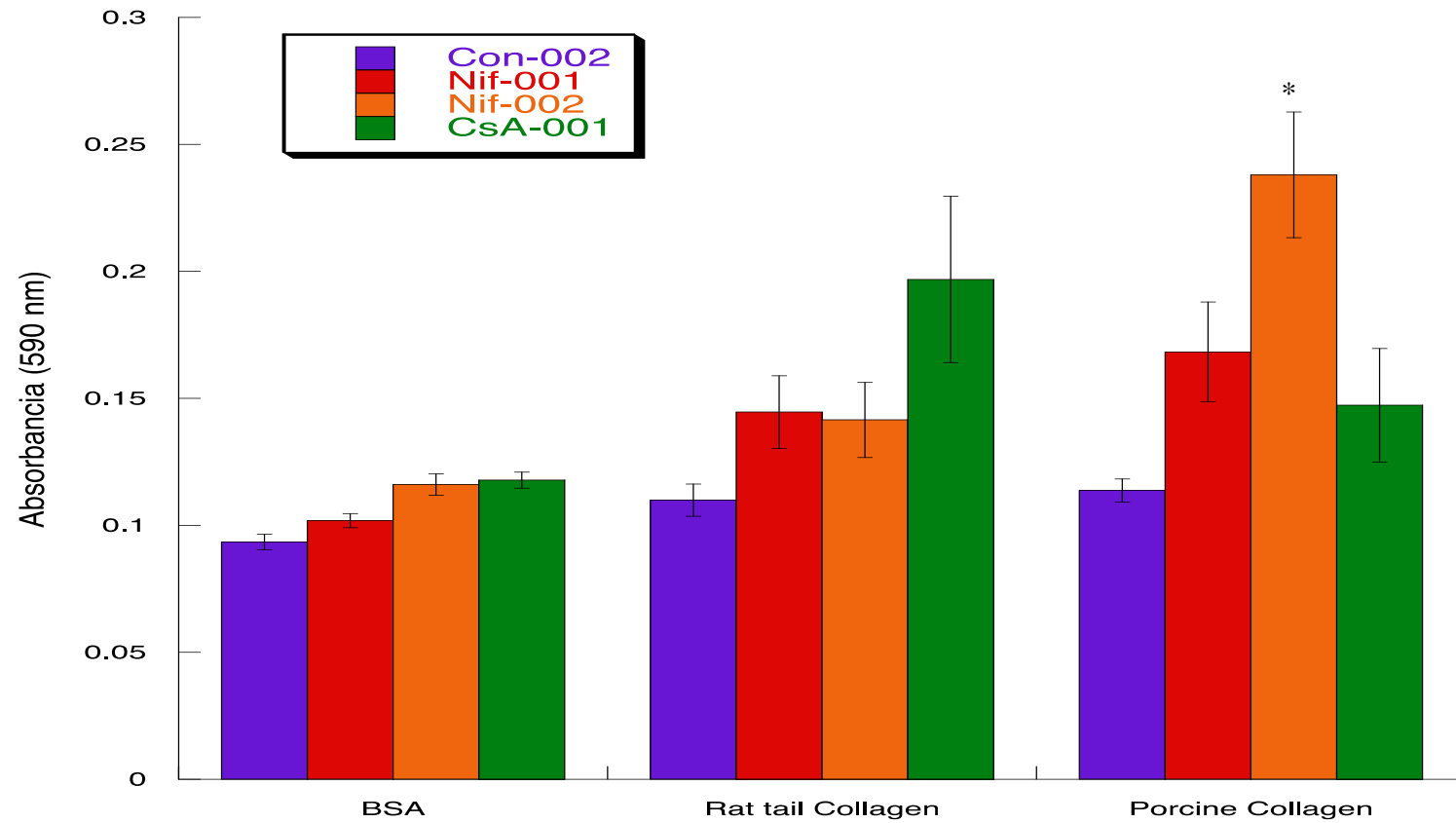


Fig. 18 **Adhesión de fibroblastos gingivales a colágenos provenientes de diferentes especies.** La gráfica representa el promedio de tres ensayos independientes (n=33). Las barras de error representan el error estándar de la muestra. El análisis estadístico fue elaborado por medio de la prueba *t de Student* (* $P \leq 0.0001$). BSA, Albúmina de suero bobino como control negativo de adhesión, Rat tail Collagen: Colágena tipo I de cola de rata, Porcine Collagen: Colágena tipo I de cerdo.

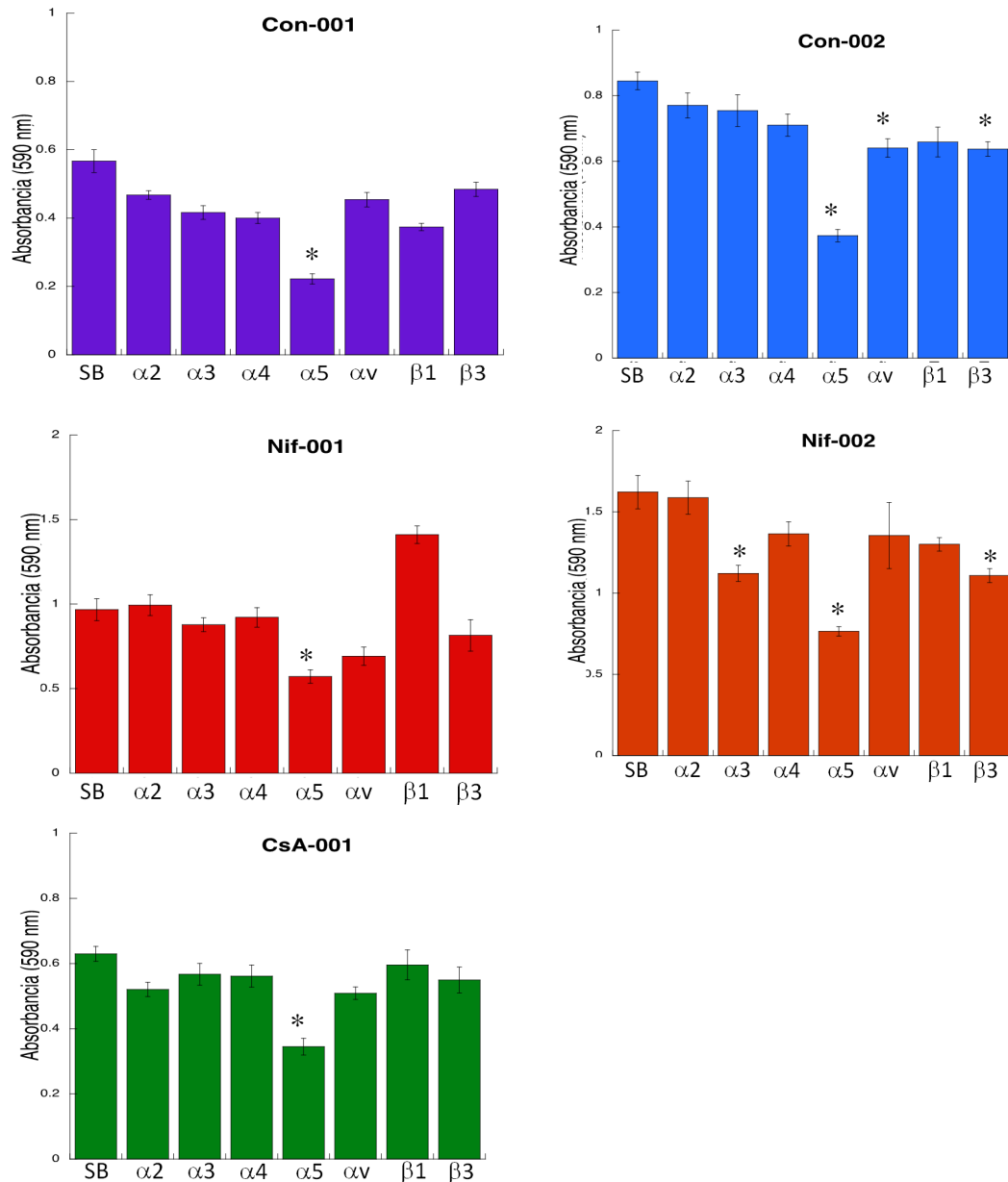


Fig. 19 **Bloqueo de la adhesión de fibroblastos gingivales a la fibronectina.** Las gráficas representan el promedio de tres ensayos independientes (n=9). Las barras de error representan el error estándar de la muestra. El análisis estadístico fue elaborado por medio de la prueba *t de Student* (* $P \leq 0.0001$).

SB, fibroblastos sin la adición de ningún anticuerpo; a2, fibroblastos + mAb anti-integrinas $\alpha 2$ (P1E6); a3, fibroblastos + mAb anti-integrinas $\alpha 3$ (P1B5); a4, fibroblastos + mAb anti-integrinas $\alpha 4$ (P4G9); a5, fibroblastos + mAb anti-integrinas $\alpha 5$ (P1D6); av, fibroblastos + mAb anti-integrinas αv (VNR 147); b1, fibroblastos + mAb anti-integrinas $\beta 1$ (TS2/16) y b3, fibroblastos + mAb anti-integrinas $\beta 3$ (AP3).

Inhibición de la Adhesión por alfa-5

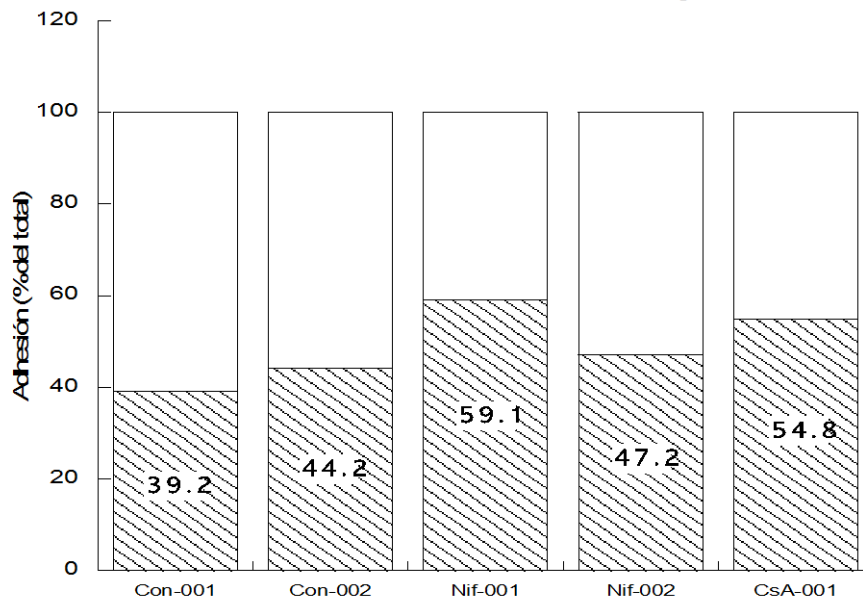


Fig. 20 **Porcentaje de inhibición de las integrinas $\alpha 5$ sobre fibronectina.** El área sombreada representa el porcentaje de células adheridas a la matriz cuando se bloquean las integrinas $\alpha 5$ con el anticuerpo P1D6. El promedio de adhesión a fibronectina sin la adición de ningún anticuerpo representa el 100%.

La diferencia en los resultados de citometría e inhibición de la adhesión, obtenidos con las integrinas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ para algunos cultivos, abrió la posibilidad de que algo similar podría ocurrir con las integrinas $\beta 1$ y el anticuerpo TS2/16, por lo que también se realizaron los ensayos de adhesión, bloqueando con este anticuerpo. Los resultados (Fig. 19) muestran que este anticuerpo podría reconocer las integrinas $\beta 1$ en los cultivos control, aunque el análisis de los resultados aquí obtenidos no tienen significancia estadística.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dentro de esta discusión no debemos ignorar los reportes previos que indican una disminución del agrandamiento gingival tras retirar la administración del fármaco (Bueno Rossy 2001, Diaz Caballero, Arevalo Tovar et al. 2009, Kantarci, Nseir et al. 2011), puesto que con ello podemos considerar que la condición es reversible. Los resultados aquí reportados si bien son repetibles en las condiciones utilizadas (tiempo y pases considerados, condiciones de cultivo), al igual que con las diferentes condiciones farmacológicas de los donadores (individuos sanos o bajo tratamiento con nifedipina o ciclosporina A), podrían no ser repetibles si se modifican variables como, estudios *in vivo* o la adición del fármaco o metabolitos secundarios al medio de cultivo, entre otras.

Con respecto a la tasa de crecimiento, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que comparativamente, los cultivos derivados de pacientes con tratamiento de nifedipina o ciclosporina A, crecen menos que los de individuos sanos (Fig. 11) y tardan más en duplicarse (Cuadro 2). Esto sugiere que la tasa de crecimiento de los fibroblastos no está asociada al agrandamiento gingival, a diferencia de diversos reportes que lo indican (Deliliers, Santoro et al. 1986, Nurmenniemi, Pernu et al. 2001, Bulut, Uslu et al. 2006). Así el agrandamiento gingival podría explicarse si en los fibroblastos gingivales “respondedores” (Fujii, Matsumoto et al. 1994, Takeuchi 2004), fuera consecuencia de un proceso fibrótico relacionado con la acumulación de colágena en el tejido conjuntivo (Hyland, Traynor et al. 2003), ocasionado por la disminución en la degradación de colágena (Lee and McCulloch 1997, Kataoka, Shimizu et al. 2001).

El patrón de expresión de integrinas en la superficie celular, obtenido en esta investigación (Cuadro 3), indica diferencias cualitativas en la expresión de integrinas en la superficie celular de los fibroblastos gingivales. Esto sugiere que el agrandamiento gingival tiene relación con la degradación de la colágena; existen reportes que indican que para la colágena, las integrinas promueven la activación de sus vías degradativas (Nakasone, Kubota et al. 2009) permitiendo vincular a las integrinas en los procesos de agrandamiento gingival ya que el reconocimiento de las proteínas de matriz extracelular por las integrinas, implica el primer paso para la activación las vías de degradación intracelular por MMPs (Nakasone, Kubota et al. 2009) o extracelular por fagocitosis (Madsen, Ingvarsen et al. 2011).

Correlacionando lo descrito por la literatura y los resultados obtenidos, sugiero que el agrandamiento gingival no está directamente involucrado con la modificación en la expresión de las integrinas $\alpha2\beta1$, reportado como el principal receptor de reconocimiento de la colágena en los fibroblastos gingivales (Abraham, Dice et al. 2007) y su degradación. Pero sí con otras integrinas como $\alpha3$, $\alpha4$, $\alpha5$, αv y $\beta3$ en las cuales se observaron modificaciones en su expresión y utilización para la adhesión a fibronectina. Hay reportes que indican que la colágena es el principal

componente de la matriz extracelular en el periodonto (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009). También se conocen proteínas que pertenecen a esta familia de moléculas estructurales, como: la fibronectina, los glicosaminoglicanos o la vitronectina, y cuyas funciones principales ya han sido descritas (Krissansen and Danen 2007, Shoulders and Raines 2009) y que también se localizan en el tejido conjuntivo, aunque en menor medida.

La detección de los receptores canónicos de integrinas para otras moléculas de la matriz extracelular en fibroblastos gingivales sin condiciones patológicas, ha sido escasamente descrito (Palaiologou, Yukna et al. 2001) y que tampoco ha sido estudiada en los fibroblastos gingivales derivados de pacientes con enfermedades periodontales como la fibromatosis (Hakki, Balci et al. 2005, Vieira-Júnior, de Oliveira-Santos et al. 2013) o el agrandamiento gingival inducido por fármacos (Kataoka, Seto et al. 2003).

Los hayazgos hechos en esta investigación contribuyen a la descripción cualitativa de la expresión de integrinas en la superficie celular de los fibroblastos gingivales, tanto de condiciones normales, como bajo tratamientos farmacológicos con nifedipina y ciclosporina A. Esta caracterización incluye integrinas que reconocen no sólo a colágena, sino a otros componentes de la matriz extracelular, donde particularmente se encontraron diferencias en la expresión, en los cultivos Nif-001 (Fig. 14) no se detectan las cadenas $\alpha 5$, relacionadas con el reconocimiento de fibronectina y en CsA-001 (Fig. 15) las integrinas $\beta 3$, involucradas en el reconocimiento de vitronectina tampoco fueron detectadas.

Los ensayos realizados muestran que los fibroblastos gingivales humanos se adhieren a fibronectina y que no existe adhesión a colágena en ninguna de las líneas de fibroblastos gingivales evaluadas (Fig. 17). Condición que contrasta con los pocos reportes existentes en los cuales se menciona que este tipo de células en ensayos *in vitro*, bajo condiciones de estudio similares a las utilizadas, se adhieren a fibronectina y colágena, siendo su unión a colágena con menor afinidad a la encontrada para fibronectina (Guo, Carter et al. 2011).

También se encontró que la adhesión a fibronectina es diferente, en el caso de los fibroblastos derivados de pacientes que consumen Nifedipina (Nif-001 y Nif-002) es prácticamente 2.5 veces mayor en comparación de los controles (Con-001 y Con-002) o los derivados de Ciclosporina A (CsA-001) (Fig. 17). Estas importantes diferencias entre los reportes encontrados y los resultados obtenidos al evaluar la adhesión con colágena de origen murino, promovieron la realización de otra serie de experimentos donde de manera paralela se evaluó la adhesión de los fibroblastos gingivales de cada condición (Fig. 18), sobre dos matríces de colágena, la utilizada anteriormente (colágena tipo I de cola de rata) y colágena tipo I de cerdo. los resultados obtenidos son muy similares y en general no presentan significancia estadística.

En el cultivo Nif-002 existe una diferencia en la adhesión ($P < 0.0001$) al compararla con el control de no adhesión a albúmina de suero bobino, este cultivo es el que se adhiere más a fibronectina (Fig. 17); aún así la adhesión a colágena porcina es muy reducida si se compara con la adhesión de cualquiera de los cultivos a fibronectina (Fig. 17 y 18). La similitud en los resultados de la adhesión a colágenas de diferentes especies, permite caracterizar la capacidad de adhesión de estas líneas celulares a colágena y fibronectina, también permite descartar un error experimental y confirmar el comportamiento no adherente de los fibroblastos gingivales sobre colágena de los cultivos Con-001, Con-002, Nif-001 y CsA-001, en las condiciones evaluadas.

A favor de estos resultados, se sabe que la secuencia de aminoácidos perteneciente a la colágena humana (Shoulders and Raines 2009), presenta variaciones estructurales mínimas, con respecto a colágenas provenientes de otras especies, como el cerdo y la rata (Shoulders and Raines 2009). Esta similitud estructural permite que las colágenas de estas especies se utilice en investigación. Se sabe que algunas características de las proteínas purificadas para ensayos, como el caso de la colágena, pueden influir en la respuesta de las células al realizar ensayos como: la longitud de los fragmentos protéicos, los métodos de purificación o el grado de desnaturalización protéica. Idealmente estas desventajas son descartadas al utilizar, con en el caso particular de esta investigación, más de un mismo tipo de proteína, proveniente de diferentes procesos de purificación.

Los resultados anteriores permiten pensar que esta falta de adhesión a la colágena represente una deficiencia en el reconocimiento de la colágena por parte de los fibroblastos gingivales y que pueda estar relacionada con sus funciones y necesidades particulares del tejido donde se alojan, ya que los fibroblastos gingivales deben tener facilidad para migrar de las porciones más internas de la lámina basal hacia las crestas epidérmicas con relativa alta frecuencia, pues su renovación es esencial en un tejido con las exigencias mecánicas y de recambio epitelial como el periodonto (Gómez de Ferraris and Campos Muñoz 2009). Como contraparte de la propuesta anterior, existe también la posibilidad de que los receptores de integrinas presentes en los fibroblastos evaluados, presenten alguna diferencia funcional o estructural relacionada con variaciones en la conformación de las cadenas de integrinas, resultado de una conformación doblada o extendida y no activada, las cuales redundan en imposibilidad de interacción de las integrinas con la matriz extracelular (Krissansen and Danen 2007).

Por último, podemos agregar que el proceso de adhesión de los fibroblastos gingivales utilizados a fibronectina corresponde, principalmente al heterodímero formado por la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Fig. 20) ya que se adhirieron prácticamente un 50% menos al bloquearse con el anticuerpo para integrinas $\alpha 5$. Estos resultados son contrastantes en la línea Nif-001 para las integrinas $\alpha 5$ (Fig. 19), puesto que a pesar de no detectarse $\alpha 5$ por citometría (Fig. 14), esta molécula claramente se

encuentra presente en esta línea celular y participa en la adhesión de la misma a fibronectina (Fig. 20). Los resultados del bloqueo de integrinas sugieren también que existe al menos otra molécula involucrada en la adhesión a fibronectina, probablemente alguna integrina que contenga cadenas $\alpha 3$, $\alpha 4$ o αv , por ser de las mayormente expresadas en fibroblastos gingivales (Palaiologou, Yukna et al. 2001) y porque en algunos cultivos se reduce parcialmente la adhesión con la participación de alguna de estas integrinas ($\alpha 3$, $\alpha 4$ o αv).

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación, es factible pensar que el agrandamiento gingival observado en los pacientes que consumen nifedipina o ciclosporina A se debe más que al incremento en la división celular, a procesos relacionados con la expresión de integrinas como elementos detonadores de las respuestas celulares incluyendo: la producción de proteínas de matriz extracelular (Bueno Rossy 2001), las vías de degradación de la colágena, de manera extracelular por medio de las MMPs o intracelular por medio de la fagocitosis y cuyas activaciones se encuentran reguladas por integrinas (Nakasone, Kubota et al. 2009), adhesión y migración celular (Sume, Kantarci et al. 2010), la regulación de los procesos de división celular, entre otros.

CONCLUSIONES

Puesto que la tasa de crecimiento celular encontrada en los fibroblastos gingivales derivados de pacientes bajo tratamiento con nifedipina o ciclosporina A en cultivo es menor a la encontrada en fibroblastos de individuos sanos, el agrandamiento gingival observado en los pacientes no involucra un incremento en la velocidad de crecimiento celular.

Hay diferencias en la expresión de integrinas en la superficie celular de los cultivos analizados, a partir de ensayos por citometría de flujo. En Nif-001 no se observó la presencia de integrinas $\alpha 5$, y en Con-001 no se detectaron integrinas $\beta 3$, mientras que las demás integrinas evaluadas no presentan diferencia en la presencia o ausencia, con respecto a los cultivos control.

Todas las líneas de fibroblastos gingivales estudiadas se adhieren a fibronectina y no a colágena, la adhesión a fibronectina es inhibida por el bloqueo de las integrinas $\alpha 5$.

A pesar de no detectar la presencia de las integrinas $\alpha 5$ en los fibroblastos del cultivo Nif-001 por medio de citometría, su presencia y funcionalidad es clara si consideramos los ensayos de bloqueo de la adhesión donde los fibroblastos de Nif-001 reducen su capacidad adhesiva a fibronectina prácticamente al 50% cuando se bloquea con un anticuerpo monoclonal la cadena $\alpha 5$ de las integrinas.

PERSPECTIVAS

Si bien los resultados obtenidos señalan a la fibrosis como la explicación más probable del agrandamiento gingival observado en pacientes que consumen nifedipina o ciclosporina A, resulta indispensable cuantificar la producción de colágena por parte de los fibroblastos gingivales en cultivo. También será conveniente realizar análisis esteroscópicos en cortes histopatológicos, que permitan caracterizar in situ las condiciones cualitativas y cuantitativas de los componentes de la encía, número y forma de los fibroblastos periodontales y gingivales, de las células del sistema inmunológico, y los vasos capilares; cantidad y edad de la colágena en el tejido conjuntivo, presencia de otro tipo de componentes de matriz extracelular.

Es conveniente considerar que los tres principales fármacos involucrados en el agrandamiento gingival (nifedipina, ciclosporina A y fenitoína) tienen como parte de sus mecanismos de acción, la modificación de la concentración de calcio intracelular en las células (Balan, Popescu et al. 2011, Smaili, Stellato et al. 2001, (Dias Corrêa, Martins Queiroz-Junior et al. 2011). En la revisión bibliográfica elaborada para esta investigación se encontró que en 2001, Arora y colaboradores reportaron que la alteración de los flujos de calcio intracelulares ocasionada por la administración de fármacos como la nifedipina, afectan la tasa de división celular de fibroblastos (Arora, Silvestri et al. 2001). No se conocen más reportes relacionados; por lo que estudiar si esta condición se relaciona con el agrandamiento gingival podría aportar valiosa información para describir la condición patológica en cuestión.

La detección y cuantificación de integrinas en la superficie celular de los fibroblastos gingivales derivados de agrandamientos ocasionados por la administración de fármacos brinda información respecto a las condiciones moleculares de las células y que deberá estudiarse a profundidad, ampliando el número de integrinas incluidas, sobre todo $\alpha 8$, que se ha reportado como abundante en fibroblastos gingivales sanos (Palaiologou, Yukna et al. 2001), incluyendo no sólo la cuantificación del RNA mensajero por PCR en tiempo real, como lo realizaron, si no considerando también técnicas como la citometría de flujo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, L. C., J. F. Dice, K. Lee and D. L. Kaplan (2007). "Phagocytosis and remodeling of collagen matrices." Experimental Cell Research **313**(5): 1045-1055.
- Acosta Gómez, A. (2006). "El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto." Universitas Odontológica [en línea] **25**.
- Alberts, B., A. Jhonson and J. Lewis (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Armitage, G. C. (2004). "Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases." Periodontology 2000 **34**(1): 9-21.
- Arora, P. D., L. Silvestri, B. Ganss, J. Sodek and C. A. G. McCulloch (2001). "Mechanism of Cyclosporin-induced Inhibition of Intracellular Collagen Degradation." Journal of Biological Chemistry **276**(17): 14100-14109.
- Balan, H., E. Popescu and G. Angelescu (2011). "Pathologic crossroads: cardiovascular diseases, periodontal diseases and calcium antagonists." Journal of Medicine and Life **4**(1): 2-10.
- Bostanci, N., T. Ilgenli, D. C. Pirhan, F. M. Clarke, W. Marcenes, G. Atilla, F. J. Hughes and I. J. McKay (2006). "Relationship between IL-1A polymorphisms and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving Cyclosporin A." Journal of Clinical Periodontology **33**(11): 771-778.
- Brinckerhoff, C. E. and L. M. Matrisian (2002). "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 207-214.
- Bueno Rossy, L. A. (2001). "Agrandamientos gingivales medicamentosos." Fundación Juan José Carraro **6** (15): 44-47.
- Bulut, S., H. Uslu, B. Handan Özdemir and O. Bulut (2006). "Analysis of proliferative activity in oral gingival epithelium in immunosuppressive medication induced gingival overgrowth." Head & Face Medicine Research **2**(3).
- Cotrim, P., H. Martelli-Junior, E. Graner, J. J. Sauk and R. D. Coletta (2003). "Cyclosporin A Induces Proliferation in Human Gingival Fibroblasts via Induction of Transforming Growth Factor- α 1." Journal of periodontology **74**(11): 1625-1633.
- Deliliers, G., F. Santoro, N. Polli, E. Bruno, L. Fumagalli and E. Risciotti (1986). "Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia." J Periodontol **57**(12): 771-775.
- Dias Corrêa, J., C. Martins Queiroz-Junior, J. Eustáquio Costa, A. Lúcio Teixeira and T. Aparecida Silva (2011). "Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features." ISRN Dentistry **2011**.
- Diaz Caballero, A., L. Arevalo Tovar and M. Fonseca Ricaurte (2009). "Agrandamiento Gingival Inducido por Nifedipina. Reporte de un Caso." Duazary **5**(2): 51-55.
- Ellis, J. S., R. A. Seymour, J. G. Steele, P. Robertson, T. J. Butler and J. M. Thomason (1999). "Prevalence of Gingival Overgrowth Induced by Calcium Channel Blockers: A Community-Based Study." Journal of periodontology **70**(1): 63-67.
- Fu, E., Y.-D. Hsieh, E. C. Shen, S. Nieh, T.-K. Mao and C.-Y. Chiang (2001). "Cyclosporin-Induced Gingival Overgrowth at the Newly Formed Edentulous Ridge in Rats: A Morphological and Histometric Evaluation." Journal of periodontology **72**(7): 889-894.
- Fujii, A., H. Matsumoto, S. Nakao, H. Teshigawara and Y. Akimoto (1994). "Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and

collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders." Arch Oral Biol **39**(2): 99-104.

Gómez de Ferraris, M. E. and A. Campos Muñoz (2009). Histología y embriología bucodental.

Guo, F., D. E. Carter, A. Mukhopadhyay and A. Leask (2011). "Gingival Fibroblasts Display Reduced Adhesion and Spreading on Extracellular Matrix: A Possible Basis for Scarless Tissue Repair?" PLoS ONE **6**(11): e27097.

Hakki, S. S., B. Balci, E. E. Hakki, E. Yilmaz and R. M. Nohutcu (2005). "Identification of the Difference in Extracellular Matrix and Adhesion Molecules of Cultured Human Gingival Fibroblasts Versus Juvenile Hyaline Fibromatosis Gingival Fibroblasts Using cDNA Microarray Analysis." Journal of Periodontology **76**(12): 2244-2253.

Hassell, T. M. and G. H. Gilbert (1983). "Phenytoin sensitivity of fibroblasts as the basis for susceptibility to gingival enlargement." The American Journal of Pathology **112**(2): 218-223.

Hattori, T., K. Nakano, T. Kawakami, A. Tamura, T. Ara and P. Wang (2009). "THERAPY FOR NIFEDIPINE-INDUCED GINGIVAL OVERGROWTH BY SAIREITO IN RATS." Eur J Med Res **14**: 497-501.

Hyland, P. L., P. S. Traynor, T. T. Myrillas, J. J. Marley, G. J. Linden, P. Winter, N. Leadbetter, T. E. Cawston and C. R. Irwin (2003). "The Effects of Cyclosporin on the Collagenolytic Activity of Gingival Fibroblasts." Journal of periodontology **74**(4): 437-445.

Jung, J., Y. Jeong, T. Jeong, H. Chung and W. Kim (2008). "Inhibition of apoptotic signals in overgrowth of human gingival fibroblasts by cyclosporin A treatment." Arch Oral Biol **53**(11): 1042-1049.

Kantarci, A., P. Augustin, E. Firatli, M. C. Sheff, H. Hasturk, D. T. Graves and P. C. Trackman (2007). "Apoptosis in gingival overgrowth tissues." J Dent Res **86**(9): 888-892.

Kantarci, A., Z. Nseir, Y.-S. Kim, S. Sume and P. Trackman (2011). "Loss of Basement Membrane Integrity in Human Gingival Overgrowth." J Dent Res **90**(7): 887-893.

Kataoka, M., J. Kido, Y. Shinohara and T. Nagata (2005). "Drug-induced gingival overgrowth--a review." Biol Pharm Bull **28**(10): 1817-1821.

Kataoka, M., H. Seto, C. Wada, J.-i. Kido and T. Nagata (2003). "Decreased expression of $\alpha 2$ integrin in fibroblasts isolated from cyclosporin A- induced gingival overgrowth in rats." Journal of Periodontal Research **38**(5): 533-537.

Kataoka, M., Y. Shimizu, K. Kunikiyo, Y. Asahara, H. Azuma, T. Sawa, J.-i. Kido and T. Nagata (2001). "Nifedipine Induces Gingival Overgrowth in Rats Through a Reduction in Collagen Phagocytosis by Gingival Fibroblasts." Journal of periodontology **72**(8): 1078-1083.

Kataoka, M., Y. Shimizu, K. Kunikiyo, Y. Asahara, K. Yamashita, M. Ninomiya, I. Morisaki, Y. Ohsaki, J.-I. Kido and T. Nagata (2000). "Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth." Journal of Cellular Physiology **182**(3): 351-358.

Kato, T., N. Okahashi, S. Kawai, T. Kato, H. Inaba, I. Morisaki and A. Amano (2005). "Impaired Degradation of Matrix Collagen in Human Gingival Fibroblasts by the Antiepileptic Drug Phenytoin." Journal of periodontology **76**(6): 941-950.

Krissansen, G. and E. Danen (2007). "Integrin Superfamily." Encyclopedia of Life Sciences.

Nurmenniemi, P. K., H. E. Pernu and M. L. E. Knuuttila (2001). "Mitotic Activity of Keratinocytes in Nifedipine- and Immunosuppressive Medication-Induced Gingival Overgrowth." Journal of periodontology **72**(2): 167-173.

Ogino, M., J. Kido, M. Bando, N. Hayashi, C. Wada, T. Nagata, F. Nishimura, Y. Soga, S. Takashiba, T. Kubota, M. Itagaki, Y. Shimada, H. Tai, H. Yoshie, N. Yamazaki, Y. Shinohara and M. Kataoka (2005). "E±2 Integrin +807 Polymorphism in Drug-induced Gingival Overgrowth." Journal of Dental Research **84**(12): 1183-1186.

Palaiologou, A. A., R. A. Yukna, R. Moses and T. E. Lallier (2001). "Gingival, Dermal, and Periodontal Ligament Fibroblasts Express Different Extracellular Matrix Receptors." Journal of periodontology **72**(6): 798-807.

Pernu, H. E., L. M. H. Pernu, K. R. H. Huttunen, P. A. Nieminen and M. L. E. Knuuttila (1992). "Gingival Overgrowth Among Renal Transplant Recipients Related to Immunosuppressive Medication and Possible Local Background Factors." Journal of periodontology **63**(6): 548-553.

Ramon, Y., S. Behar, Y. Kishon and I. S. Engelberg (1984). "Gingival hyperplasia caused by nifedipine ,Â a preliminary report." International Journal of Cardiology **5**(2): 195-204.

Resch, K. and M. Szamel (1997). "Molecular mechanisms of the immunosuppressive action of cyclosporin A." International Journal of Immunopharmacology **19**(9,Ä10): 579-585.

Sakagami, G., E. Sato, Y. Sugita, T. Kosaka, K. Kubo, H. Maeda and Y. Kameyama (2006). "Effects of nifedipine and interleukin-1 α on the expression of collagen, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human gingival fibroblasts." Journal of Periodontal Research **41**(4): 266-272.

Sanz, M. (2012). "Current Use of Calcium Channel Blockers (CCBs) is Associated with an Increased Risk of Gingival Hyperplasia." Journal of Evidence Based Dental Practice **12**(3, Supplement): 147-148.

Sato, N. and A. Fujii (2008). "Effects of interleukin-1α on the production and release of basic fibroblast growth factor in cultured nifedipine-reactive gingival fibroblasts." Journal of Oral Science **50**(1): 83-90.

Shoulders, M. and R. Raines (2009). "COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY." Annu Rev Biochem **78**: 929-958.

Smaili, S. S., K. A. Stellato, P. Burnett, A. P. Thomas and L. D. Gaspers (2001). "Cyclosporin A Inhibits Inositol 1,4,5-Trisphosphate-dependent Ca²⁺ Signals by Enhancing Ca²⁺ Uptake into the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria." Journal of Biological Chemistry **276**(26): 23329-23340.

Sobral, L. M., F. Aseredo, M. Agostini, A. Bufalino, M. C. C. Pereira, E. Graner and R. D. Coletta (2012). "Molecular events associated with ciclosporin A-induced gingival overgrowth are attenuated by Smad7 overexpression in fibroblasts." Journal of Periodontal Research **47**(2): 149-158.

Sobral, L. M., M. G. Kellermann, E. Graner, H. Martelli-Junior and R. D. Coletta (2010). "Cyclosporin A-induced gingival overgrowth is not associated with myofibroblast transdifferentiation." Brazilian Oral Research **24**: 182-188.

Sorsa, T., L. Tjäderhane and T. Salo (2004). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases." Oral Diseases **10**(6): 311-318.

Sousa, C., C. Navarro and M. Sposto (2011). "Clinical Assessment of Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth in a Group of Brazilian Patients." ISRN Dentistry **2011**.

- Starzl, T. E., R. Weil, S. Iwarsuki, G. Klintmalm, G. P. J. Schröter, L. J. Koep, Y. Iwaki, P. I. Terasaki and K. A. Porter (1980). "The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation." Sug Gynecol Obstet **151**(1): 17-26.
- Sume, S., A. Kantarci, A. Lee, H. Hasturk and P. Trackman (2010). "Epithelial to Mesenchymal Transition in Gingival Overgrowth." Am J Pathol **177**(1): 208-218.
- Takeuchi, R. (2004). "The effect of basic fibroblast growth factor on cell cycle in human gingival fibroblasts from nifedipine responder and non-responder." Journal of Oral Science **46**(1): 37-44.
- Tavakoli, M., E. Bateni, F. Attarbashi-Moghadam, A. Talebi, J. Yaghini and A. Mogharehabet (2011). "Comparison of fibronectin in human marginal gingiva and interdental papilla using immunohistochemistry." Dent Res J **8**(Suppl1): S109-S113.
- Uzel, M., A. Kantarci, H. Hong, C. Uygur, M. Sheff, E. Firatli and P. Trackman (2001). "Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth." J Periodontol **72**(7): 921-931.
- Van Der Pauw, M. T. M., V. Everts and W. Beertsen (2002). "Expression of integrins by human periodontal ligament and gingival fibroblasts and their involvement in fibroblast adhesion to enamel matrix-derived proteins." Journal of Periodontal Research **37**(5): 317-323.
- Vieira-Júnior, J. R., C. de Oliveira-Santos, R. Della-Coletta, D. Cristianismo-Costa, L. M.-R. Paranaíba and H. Martelli-Júnior (2013). "Immunoexpression of $\alpha 2$ -integrin and Hsp47 in hereditary gingival fibromatosis and gingival fibromatosis-associated dental abnormalities." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **18**(1): e45-e48.
- Wiebe, C. B. and E. E. Putnins (2000). "The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology — An Update " J Can Dent Assoc **66**: 594-597.
- Woesner, F. (2000). Matriz Metalloproteinase Protocols. New Jersey, Humana Press.