



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE INTEGRINAS EN FIBROBLASTOS DE PERSONAS CON
AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR MEDICAMENTOS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. EXP. MARCO JULIO SÁNCHEZ ROJAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: M en C. DIANA ELODIA AGUILAR DE LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE INTEGRINAS EN FIBROBLASTOS DE PERSONAS CON
AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR MEDICAMENTOS.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. EXP. MARCO JULIO SÁNCHEZ ROJAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: M en C. DIANA ELODIA AGUILAR DE LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2019

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/1240/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de octubre de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de **Biología experimental** del estudiante **SÁNCHEZ ROJAS MARCO JULIO** con número de cuenta **304182398** con la tesis titulada "**EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE INTEGRINAS EN FIBROBLASTOS DE ENCÍAS CON AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR MEDICAMENTOS**", realizada bajo la dirección del Dr. Carlos Rosales Ledezma, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
Vocal: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Secretario: M EN C. DIANA ELODIA AGUILAR DE LEÓN
Suplente: DRA. EILEEN URIBE QUEROL
Suplente: DRA. YVONNE JANE ROSENSTEIN AZOULAY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de mayo de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO
Edificio D, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Al programa de posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo con la beca de manutención (N°464043)

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

Dr. Carlos Rosales Ledezma, M. en C. Diana Elodia Aguilar León y Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Agradecimientos personales

A mi madre: Sara Rojas Dotor, por ser mi modelo a seguir, ser mi inspiración y por transmitirme un espíritu de fortaleza, lucha y tenacidad además de enseñarme que nunca debo rendirme ante las adversidades.

A mi padre: Víctor M. Domínguez Hernández, por apoyarme, enseñarme, ayudarme, aconsejarme y siempre motivarme a ser mejor cada día.

A mis hermanos: Daniel y David, por ser mis amigos y cómplices, y convertirse en los mejores hermanos que alguien podría pedir.

A mi novia: Coral, agradezco el cariño y el soporte incondicional que me brindaste, así como todo este tiempo que me apoyaste al realizar este proyecto.

A mi amigos y compañeros de laboratorio: Carlos, Víctor, Alan, Rafa y Valeria, quienes me permitieron mejorar, compartir y enriquecer diariamente ésta incomparable experiencia.

A mis amigos: Venancio y Jonatan, por su apoyo y amistad al estar siempre presentes incluso en las situaciones difíciles.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma por su constante apoyo y dirección académica

Agradezco a la Dra. Eileen Uribe Querol por proporcionarnos las células de fibroblastos gingivales y por su disposición para asesorarme y apoyar este proyecto.

Agradezco a la M. en IBB Nancy Yorley Mora Pérez por su excelente ayuda técnica.

Agradezco al laboratorista Osvaldo Martínez Garay por su asistencia en el laboratorio

ÍNDICE

Tabla de contenido

RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 El Periodonto	11
1.2 Agrandamiento gingival	14
1.2.1 Agrandamiento gingival inducido por medicamentos	15
1.2.2 Anticonvulsivos (Fenitoína)	16
1.2.3 Bloqueadores de canales de calcio (Nifedipina)	17
1.2.4 Inmunosupresores (Ciclosporina A)	17
1.3 Prevalencia	18
1.4 Matriz extracelular	20
1.4.1 Componentes principales de la matriz extracelular de la encía	21
1.4.2 Colágena	21
1.4.3 Elastina	22
1.4.4 Fibronectina	22
1.5 Fibroblastos	23
1.6 Integrinas	24
1.6.1 Ligandos de las integrinas	29
1.6.2 Vías de señalización de integrinas	30
1.6.3 Vía de señalización de FAK	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVO GENERAL.....	33
4.1 Objetivos particulares	34
5. METODOLOGÍA.....	34
5.1 Expresión de Integrinas	35
5.2 Ensayos de adhesión	36
5.3 Ensayos de herida	37
5.3.1 Preparación de placa de cultivo	37
5.3.2 Cultivo celular	37
5.3.3 Herida	37
5.4 Estimulación de fibroblastos por adhesión	38

5.4.1 Extracción de proteínas totales de fibroblastos	38
5.4.2 Electroforesis	39
5.4.3 Western blot	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Expresión de integrinas en fibroblastos de encía	40
6.2 Los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina tienen mayor adhesión a colágena y a fibronectina.	46
6.3 Los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina presentan menor migración sobre colágena y sobre fibronectina.	48
6.4 Señalización por integrinas en fibroblastos gingivales.	51
7. DISCUSION	55
8. CONCLUSIONES	59
9. PERSPECTIVAS	59
10. ANEXO	61
10. 1 Gingivectomía	61
10.2 Toma de encía de individuos sanos	62
10.3 Generación de cultivos celulares a partir de muestras de encía	62
11. REFERENCIAS	63

RESUMEN

El agrandamiento gingival es el aumento del volumen de la encía de manera exagerada. Se ha descrito como un efecto secundario al uso de fármacos principalmente la fenitoína (anticonvulsivante), nifedipina (antagonista del calcio) y ciclosporina (inmunosupresor selectivo). En la mayoría de los casos provocan aumento de colágena de la matriz extracelular. Actualmente no se sabe que otras funciones de los fibroblastos gingivales, además del mantenimiento de la matriz extracelular, estén alteradas en personas que toman alguno de estos medicamentos. En este trabajo investigó la expresión de integrinas y sus funciones relacionadas con la adhesión y migración celular que pudieran estar alteradas en fibroblastos gingivales de individuos con agrandamiento gingival inducido por nifedipina. Se obtuvieron fibroblastos gingivales obtenidos de encía sana y de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina para ser cultivados. Evaluamos la expresión de integrinas, migración y adhesión de los fibroblastos gingivales y la activación de ERK de la vía de señalización de las MAP cinasas. Las integrinas $\alpha 2$ registraron menor expresión que las integrinas $\alpha 3$ en los fibroblastos de los pacientes que tomaron nifedipina (NIF) a diferencia de los fibroblastos de encía sana (Control). Los fibroblastos NIF se adhieren más a fibronectina y colágena, a diferencia de los fibroblastos Control. La migración es menor en los fibroblastos NIF comparadas con las de fibroblastos Control sobre colágena y fibronectina. En los fibroblastos Control adheridos en sustratos de albumina o colágena se encontró la proteína ERK activada. En los fibroblastos NIF adheridos sobre fibronectina la expresión de ERK fosforilado fue menor que en los fibroblastos NIF cultivados sobre albumina. La expresión de las integrinas y sus características de adhesión y migración se ven alteradas en fibroblastos provenientes de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina a diferencia de los provenientes de encía sana.

ABSTRACT

Overgrowth gingival is an exaggerated increase in gum volume. It has been described as a side effect to the use of drugs mainly phenytoin (anticonvulsant), nifedipine (calcium antagonist) and cyclosporine (selective immunosuppressant). In most cases they cause an increase in collagen in the extracellular matrix. Currently it is not known that other functions of gingival fibroblasts, in addition to the maintenance of the extracellular matrix, are altered in people taking any of these medications. In this work he investigated the expression of integrins and their functions related to cell adhesion and migration that could be altered in gingival fibroblasts of individuals with gingival enlargement induced by nifedipine. Gingival fibroblasts obtained from healthy gum and gum were obtained from patients with gingival enlargement induced by nifedipine to be cultured. We evaluate the expression of integrins, migration and adhesion of gingival fibroblasts and the activation of ERK of the signaling pathway of MAP kinases. The $\alpha 2$ integrins recorded less expression than the $\alpha 3$ integrins in the fibroblasts of patients who took nifedipine (NIF) as opposed to healthy gum fibroblasts (Control). NIF fibroblasts adhere more to fibronectin and collagen, unlike Control fibroblasts. Migration is lower in NIF fibroblasts compared to those of Control fibroblasts on collagen and fibronectin. ERK protein was found in Control fibroblasts adhered to albumin or collagen substrates. In NIF fibroblasts adhered to fibronectin the expression of phosphorylated ERK was lower than in NIF fibroblasts grown on albumin. The expression of integrins and their adhesion and migration characteristics are altered in gum fibroblasts from patients with gingival enlargement induced by nifedipine as opposed to those from healthy gum.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Periodonto

El periodonto es el tejido que rodea a los dientes y tienen como función la protección, la fijación y el soporte de los dientes. Además de ayudar a conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad oral. El periodonto está formado por la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar (Figura 1).

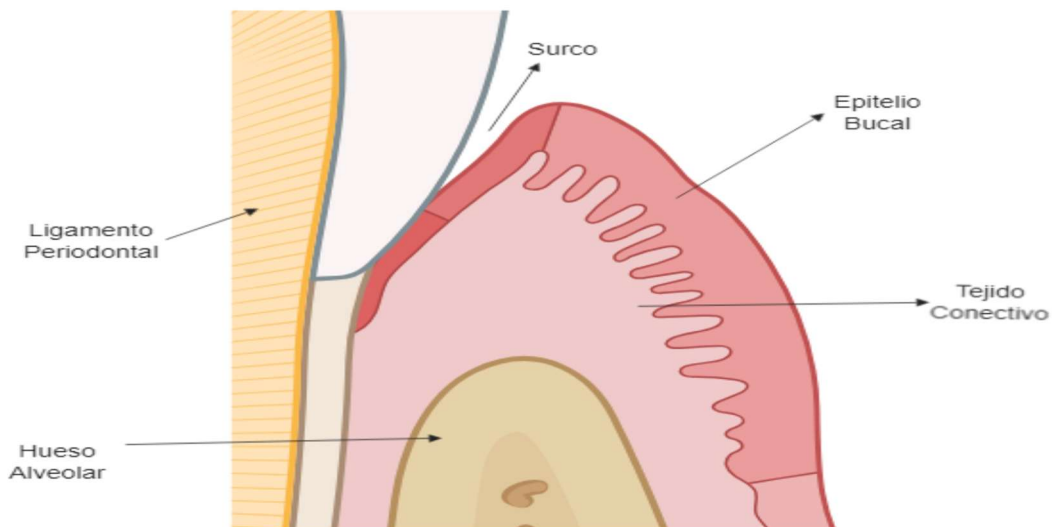


Figura 1. Partes del periodonto. Esquema en donde se observan las partes de una encía sana, en el límite del epitelio bucal podemos ver un tejido con terminación ondulatoria que representa el tejido conectivo. El surco es un espacio que hay entre el diente y epitelio. Ligamento periodontal es una capa de fibras que unen al diente con el hueso alveolar. El hueso alveolar sostiene los a los dientes y les da firmeza.

El ligamento periodontal es una capa delgada de fibras de colágena que está altamente vascularizada. El ligamento periodontal se une por un lado al cemento radicular, que rodea la raíz de los dientes y por otro al hueso alveolar de los

maxilares, proporcionando así, sostén a los dientes. (Carranza et al. 2002). El hueso alveolar es la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes. Está compuesto por hueso que se forma tanto por células del folículo o saco dentario como por células que son independientes del desarrollo dentario. (Carranza et al. 2002).

El cemento radicular es un tejido mineralizado especializado que recubre la raíz del diente, aunque también se puede encontrar recubriendo pequeñas porciones de la corona de los dientes. No contiene vasos sanguíneos, ni linfáticos, carece de inervación, no experimenta remodelación o resorción fisiológica. El cemento radicular cumple diferentes funciones, en él se insertan las fibras del ligamento periodontal y contribuye en el proceso de reparación, cuando la superficie radicular ha sido dañada. (Carranza et al. 2002).

La encía es la parte de la mucosa oral que está conformada por tejido conectivo denso y epitelio escamoso queratinizado. La encía brinda protección y recubrimiento a las estructuras de la apófisis alveolar: hueso alveolar, hueso esponjoso, hueso compacto externo de los maxilares y además rodea el cuello de los dientes. (Newman et al. 2014). De acuerdo con su histología, la encía se puede dividir en tres partes (Figura 2):

Encía libre o marginal: Esta parte es considerada el borde de la encía ya que rodea a los dientes en forma de collar. Esta parte de la encía se recambia más rápido que el resto de la encía; permitiendo así una limpieza constante del tejido y evitando el crecimiento bacteriano. Este recambio se debe a que la proliferación y descamación del epitelio se produce en un promedio de siete días, la mitad del tiempo del resto de epitelio de la encía.

Encía adherida o insertada: Esta parte es la continuación de la encía libre y se extiende en dirección apical tapizando al hueso alveolar.

Encía interproximal: Se encuentra en los espacios entre cada diente adaptándose a la forma y dimensiones de cada diente. La encía interproximal se distingue por su forma triangular ocupando el espacio entre dos dientes continuos. La encía interproximal es la primera en afectarse por el agrandamiento gingival.

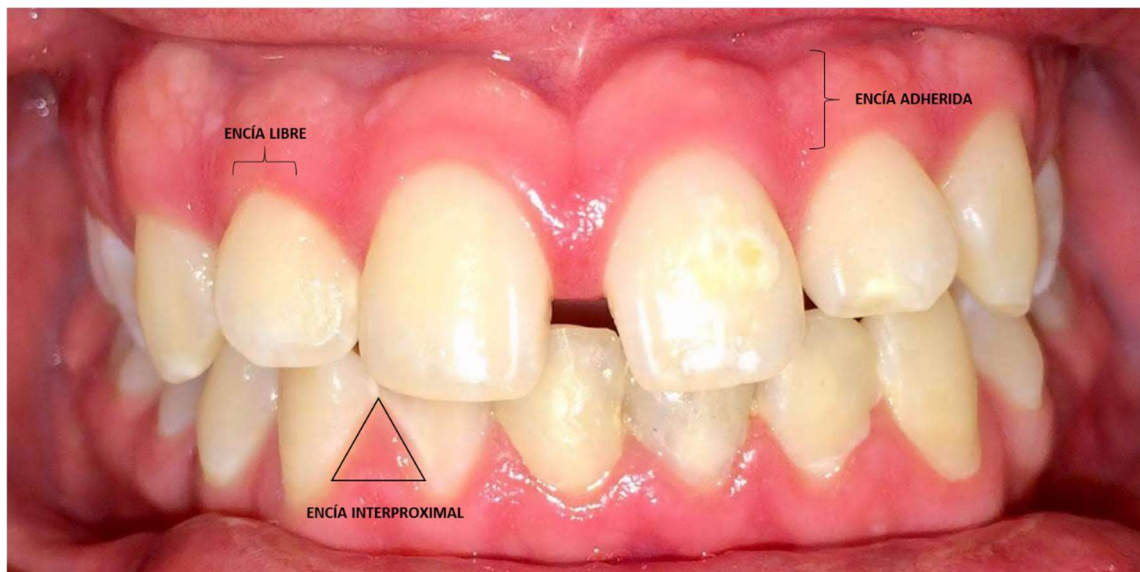


Figura 2. Partes de la encía sana. En la fotografía se muestra las partes de la encía: Encía Adherida es el espacio que se encuentra entre la mucosa y la encía libre, la encía libre se encuentra en los bordes de los dientes y la encía interproximal es el espacio que se encuentra entre cada diente simulando un triángulo. Fotografía donada por Odont. Alan Osegueda Espinosa.

Histológicamente, la encía está formada por epitelio y tejido conectivo. El epitelio es un tejido de recubrimiento que puede ser queratinizado o paraqueratinizado y está formado por cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo. El tejido conectivo está formado por la matriz extracelular (MEC), que es una malla de fibras de proteínas como fibronectina, colágenas, laminina entre otras. En la encía, el tejido conectivo está formado principalmente por fibras de colágenas. Estas fibras

constituyen el 60% del volumen total de la encía. Dentro del tejido conectivo se encuentran células llamadas fibroblastos. Los fibroblastos son los encargados del mantenimiento de la encía y representan 5% de las células en la encía. Las funciones principales de los fibroblastos son: agregar, sustituir y/o remover matriz extracelular (MEC) para mantener en condiciones óptimas el tejido conectivo. Otros componentes de la encía son los vasos sanguíneos, los nervios y otras células que pertenecen al sistema inmune. Entre estas células encontramos mastocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, que ellas protegen a la encía de infecciones. (Newman et al. 2010).

1.2 Agrandamiento gingival

El agrandamiento gingival es una enfermedad crónica que se caracteriza por ser un proceso en el que la encía aumenta su volumen de manera exagerada y con el tiempo se va deformando (Armitage et al. 1999, Newman et al. 2004 y Mishra et al. 2011). La terminología actual aceptada para el aumento de tamaño de la encía es agrandamiento o crecimiento gingivales excesivo. Se trata de términos clínicos estrictamente descriptivos y anula las connotaciones patológicas erróneas de los términos usados en el pasado, como gingivitis hipertrófica o hiperplasia gingival (Somacarrera, 2013). El agrandamiento gingival no sólo es un problema de estética, sino también implica problemas de lenguaje, de masticación y de higiene oral. Los síntomas clínicos en el agrandamiento gingival incluyen trastornos periodontales, sangrado gingival (espontáneo o inducido), migración patológica dentaria e incluso alteración de la oclusión en casos severos (Brunet et al. 1996). La observación histológica del agrandamiento gingival ha permitido concluir que el fundamento

patológico de esta alteración es un incremento de las fibras de colágena dependiente de una alteración en la homeostasis de los fibroblastos (Sakamoto et al. 2002). El agrandamiento gingival también se considera una enfermedad multifactorial en donde la placa bacteriana juega un papel importante (Zerón y Sautto. 2016). Otros factores que contribuirían aumentar el riesgo de un agrandamiento gingival son: la mala higiene oral, el acúmulo de biopelícula microbiana, la inflamación aguda o crónica en los tejidos periodontales y la presencia de bolsas periodontales, donde la duración del proceso inflamatorio y la dosis acumulada de los medicamentos pueden contribuir al desarrollo del agrandamiento gingival (Zerón y Sautto. 2016).

Existen diferentes tipos de agrandamiento gingival incluyendo: la fibrosis gingival hereditaria, relacionada con enfermedades sistémicas, el agrandamiento condicionado o neoplásico, inducido por crecimiento anormal de células, el agrandamiento inflamatorio, causado por un proceso inflamatorio y el agrandamiento gingival inducido por medicamentos, que es un efecto secundario de algunos medicamentos (Carranza. 2002).

1.2.1 Agrandamiento gingival inducido por medicamentos

Los medicamentos asociados al agrandamiento gingival pertenecen a tres grupos de fármacos: los anticonvulsivos, como la fenitoína (Arya et al. 2012), los bloqueadores de canales de calcio, como la nifedipina (Fu. et al., 1998., Mironiuc-Cureu et al. 2014) y los inmunosupresores, como la ciclosporina A (Oettinger et al. 2000). El inicio del agrandamiento gingival por medicamentos se produce en las papilas gingivales interdentes que progresivamente adquieren una forma lobulosa,

desarrollándose en sentido vestibulo lingual y vertical. Algunos estudios histopatológicos mencionan que las características del agrandamiento gingival inducido por los tres tipos de medicamentos son muy similares en modelos experimentales (Lucas et al. 1985, Dill 1997). Las características generales del agrandamiento gingival son un epitelio escamoso paraqueratinizado, un tejido conectivo con fibrosis por colágena, un infiltrado de células inmunológicas e incremento en los glicosaminoglicanos (GAG) (Castro et al., 2010).

1.2.2 Anticonvulsivos (Fenitoína)

La fenitoína es un anticonvulsivo de uso común recetado para el control de la epilepsia. La fenitoína inhibe la propagación de la actividad convulsiva en la corteza motora cerebral, al promover la difusión de sodio desde las neuronas y estabilizar el umbral sináptico (U.S. National Library of medicine. 2018). La fenitoína fue utilizada por primera vez en la década de 1930 y su efecto secundario sobre la encía se reportó por primera vez poco tiempo después en 1939 (Kimball. 1939). El mecanismo de acción por el cual la fenitoína induce un agrandamiento gingival no se conoce. La teoría más probable es que la población de fibroblastos gingivales reacciona a la fenitoína provocando una alteración en sus funciones. Los fibroblastos alterados promueven la acumulación de tejidos conectivos, principalmente colágena, en individuos susceptibles. También se cree que hay un catabolismo reducido en las moléculas de colágena dentro de los tejidos gingivales (Corrêa. 2011).

1.2.3 Bloqueadores de canales de calcio (Nifedipina)

Los bloqueadores de canales de calcio son una familia de fármacos extensa y su principal función es bloquear la corriente de calcio hacia el interior de las células.

Las dihidropiridinas son una familia de medicamentos basados en la molécula piridina que bloquean a los canales de calcio tipo L y se utilizan en el tratamiento de diversas patologías cardiacas y de la hipertensión. Algunos derivados de las dihidropiridinas son: amlodipina, felodipina, nifedipina, nisoldipino y nitrendipina.

La nifedipina es el medicamento más comúnmente relacionado con el agrandamiento gingival (Sousa. 2008). El primer caso de agrandamiento gingival inducido por nifedipina se presentó en el año de 1984 (Miranda. 2001). En este caso se desconoce el mecanismo de acción por el cual la nifedipina induce un agrandamiento gingival. Se cree que el bloqueo de los canales de calcio lleva a una suspensión en la inhibición de la colágena sintetasa y también a la activación de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs, por sus siglas en inglés). Como la colágena sintetasa es encargada de la síntesis de fibras de colágena y las MMPs están encargadas de la degradación de la colágena, el resultado es un aumento en la cantidad de colágena producida. (Sato et al. 2006)

1.2.4 Inmunosupresores (Ciclosporina A)

Los inmunosupresores como la ciclosporina A y el tacrolimus inhiben la proliferación de los linfocitos T. Por esta acción, los inmunosupresores, son utilizados frecuentemente para prevenir el rechazo de órganos trasplantados. El uso frecuente de la ciclosporina A en pacientes con trasplante de riñón, tiene como efecto secundario, la aparición de agrandamiento gingival en muchos de ellos. El

mecanismo de acción para este efecto secundario de la ciclosporina A tampoco es conocido. Algunos reportes sugieren que en el agrandamiento gingival inducido por ciclosporina A se presentan cambios en la morfofisiología de los fibroblastos gingivales (Ríos Villavicencio et al. 2013, Campolo et al., 2015). En un modelo de rata el tratamiento con ciclosporina A lleva a un agrandamiento gingival (Sato et al., 2006). Usando este modelo, se ha observado que los fibroblastos gingivales presentan alteraciones histopatológicas y morfológicas (Kataoka et al., 2003, 2005,) que llevan a la acumulación de colágena. Por otro lado, en estudios *in vitro* con fibroblastos humanos tratados con ciclosporina A, muestran que la degradación de matriz extracelular se ve alterada, dando como resultado un aumento del tejido conectivo en la encía (Gagliano et al. 2005, Bolzani et al. 2000).

1.3 Prevalencia

La prevalencia del agrandamiento gingival inducido por medicamentos se estima en 70% en el caso de la fenitoína (Brunet et al. 2001), en 83% en el caso de la nifedipina (Nishikawa et al. 1996, Kataoka et al. 2005, Miranda et al. 2005) y 50-80% en el caso de la ciclosporina A (Pernu et al. 1992, Somacarrera et al. 1994, Kataoka et al. 2005). Tan solo en Estados Unidos existen 3 millones de individuos que sufren trastornos convulsivos y el 20% de éstos son tratados con fenitoína (Shimada et al. 2014). También entre los pacientes con enfermedades autoinmunes y los pacientes que reciben trasplantes de órganos la ciclosporina A es el fármaco inmunosupresor más prescrito. En Estados Unidos las ventas de ciclosporina A ascienden a 1.6 mil millones de dólares con una tasa de crecimiento de 3.5% (Trackman et al. 2015).

Estos datos indican que estos medicamentos seguirán siendo usados y muchas personas propensas a resentir los efectos secundarios que provocan estos fármacos serán víctimas del agrandamiento (Trackman et al. 2015).

En México, no se conoce la cantidad de pacientes que presentan este tipo de agrandamiento gingival, pero hay un gran número de personas que usan alguno de estos fármacos. Muchos de los pacientes con hipertensión arterial toman nifedipina y un gran número de los pacientes con trasplante de riñón toman ciclosporina A. De igual forma, la mayoría de los pacientes con epilepsia toman fenitoína. (Wentz et al. 2012).

El agrandamiento gingival inducido por medicamentos se desarrolla aproximadamente tres meses después de iniciado el tratamiento con el medicamento. Las características clínicas son similares con todos los medicamentos. La encía crece mostrando daño fibrótico e inflamación y puede alcanzar un tamaño considerable entre 9 y 12 meses de iniciado el tratamiento (Ramírez Rámiz A, et al., 2017). Los individuos que toman estos medicamentos y desarrollan el agrandamiento gingival, deben someterse a cirugías orales al menos una vez por año, o en casos más severos cada 6 meses, para retirar el exceso de encía (Ilgenli et al., 1999).



Figura 3. Encía con agrandamiento gingival. Fotografía en donde se observan grandes bultos en la zona de la encía interproximal los cuales empiezan a cubrir gran parte de los dientes, denominado agrandamiento gival. Modificada de Ilenli et al. 1999

1.4 Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) son las proteínas que están inmovilizadas fuera de una célula y le dan soporte físico, la MEC que participa activamente en el establecimiento, la separación y el mantenimiento de tejidos y órganos diferenciados. Además, la MEC tiene un papel importante en la homeostasis de todas las células, a través de regular la abundancia de factores de crecimiento, el grado de hidratación y el pH del entorno local. Estas diversas funciones se logran a través de su compleja composición química y organización. La MEC se compone principalmente de dos clases principales de macromoléculas: proteínas fibrosas y glicoproteínas. Entre las proteínas fibrosas encontramos a las colágenas, la fibronectina y la elastina. Entre las glicoproteínas encontramos proteoglicanos (PG) y laminina (Mouw et al. 2014).

1.4.1 Componentes principales de la matriz extracelular de la encía

1.4.2 Colágena

Las fibras de colágena son el componente principal de la MEC en casi cualquier tejido y posiblemente las proteínas más dominantes. Cada tipo de colágena está compuesto de homotrímeros y heterotrímeros formados por tres cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas α (Mouw et al. 2014). La característica estructural de todas las colágenas es una triple hélice: una hélice derecha apretada de tres cadenas α , cada una de las cuales contiene una o más regiones caracterizadas por la región repetida de aminoácidos Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido, pero con frecuencia son prolina e hidroxiprolina (Alberts et al., 2002, Mouw et al., 2014). Estos forman la estructura helicoidal triple central del procolágeno y el colágeno. Tres cadenas α se ensamblan intracelularmente en la triple hélice después del inicio de este proceso por el dominio C-termina (Mouw et al., 2014). Las colágenas fibrilares clásicas incluyen: tipo I, la colágena más frecuente que se encuentra en la piel, el tendón, el hueso, la córnea, el pulmón, la vasculatura y la encía; tipo III, que se encuentra en tejidos relativamente elásticos, como la piel embrionaria, el pulmón y en los vasos sanguíneos; tipo IV, es un componente de la lámina basal, se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos y nervios; y tipo VII, forma fibras de anclaje a la membrana subepitelial (Fratzl. 2008)

La colágena tipo I es la más abundante en la encía y se ordena en dos tipos de fibras, las primeras son largas, densas y espesas, el segundo consiste en fibras laxas y cortas formando una red reticular fina. La colágena tipo III son fibras abundantes alrededor de los vasos sanguíneos, son fibras delgadas en forma de red que y se

encuentran cerca de la membrana basal. La colágena tipo IV también se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos, pero también rodea a los nervios, es componente de la lámina basal. La colágena tipo VII forma fibras de anclaje a la membrana subepitelial

1.4.3 Elastina

La elastina es una proteína clave de la MEC que proporciona resistencia y elasticidad a los tejidos y órganos. En tejidos con estrés mecánico, como la encía, la elastina es de gran importancia. Su función está asociada con la colágena ya que determina las propiedades mecánicas de la encía. La elastina es sintetizada y secretada por fibroblastos, La elastina comprende aproximadamente el 90% de la fibra elástica el otro 10% lo componen las microfibrillas. (Alberts et al. 1994, Mouw et al., 2014).

1.4.4 Fibronectina

La fibronectina se secreta como una glicoproteína adhesiva de tamaño muy grande, puede encontrarse libre en el plasma o formando fibras en la MEC. La molécula de fibronectina es sintetizada por los fibroblastos y consiste en tres módulos de unidades repetitivas, cada uno de las cuales tiene diferentes estructuras, denominadas tipo I, tipo II y tipo III. En la encía, las fibras de fibronectina están alrededor de las células (Lucena et al. 2007). En la porción central de la fibronectina se ha identificado una región de unión a células de 105 kDa, la cual contiene la secuencia arginina (R), glicina (G) y ácido aspártico (D), que funciona como sitio de unión a las integrinas de las células (Lucena et al., 2007, Mouw et al. 2014). La

unión entre la fibronectina y las integrinas conduce a la agregación y activación de estos receptores (Singh P. et al., 2010).

1.5 Fibroblastos

Los fibroblastos son las células encargadas de la homeostasis en los tejidos conectivos. Mantienen el equilibrio entre la síntesis y degradación de colágena durante la remodelación del tejido conectivo (Shoulders. et al. 2009, Acosta. 2006).

Los fibroblastos son células con morfología y tamaño variables, dependiendo del órgano donde se encuentren y de su estado de activación. En general, los fibroblastos presentan formas fusiformes (forma de huso) o estrelladas, con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser relativamente cortas y anchas, o bien largas, delgadas y muy ramificadas. La morfología de estas células se debe en parte a que tienen un citoesqueleto muy diferenciado, en el cual la actina y la actinina α se concentran en la periferia celular junto con miosina. La actinina α permite que la actina se ancle a la membrana plasmática interna mediante su unión con proteínas transmembrana conocidas como integrinas.

Los fibroblastos migran de manera guiada al sitio de interés. Durante su migración, el fibroblasto se alarga y se ancla a proteínas de matriz extracelular para generar una tracción que le permite moverse. Este proceso se realiza mediante las integrinas, que establecen una comunicación entre los microtúbulos y las fibras de actina con las proteínas de matriz extracelular (Uribe y Rosales. 2016).

En el periodonto existen dos tipos de fibroblastos: los fibroblastos gingivales y los fibroblastos del ligamento periodontal. Los fibroblastos gingivales tienen la función

de producen y mantienen la matriz extracelular de la encía (libre, adherida e interproximal). (Acosta. 2006). Por otro lado, los fibroblastos del ligamento periodontal tienen la función de producir, mantener y remodelar el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar. Una de las diferencias principales de los fibroblastos gingivales en comparación con los fibroblastos del ligamento periodontal es la expresión de las integrinas (Larjava et al. 2011).

1.6 Integrinas

Las integrinas son receptores de membrana heterodiméricos, formados por dos subunidades de proteínas globulares: la cadena α y la cadena β . Se expresan de forma ubicua en prácticamente todas las células del organismo (Bouvard. et al 2013). Participan en las interacciones de la célula con la matriz extracelular y en interacciones de célula con otras células (Bouvard et al. 2013). Existen 18 subunidades α y 8 subunidades β las cuales pueden formar 24 integrinas diferentes con afinidad para múltiples ligandos (Hynes. 2002) (Figura 4).

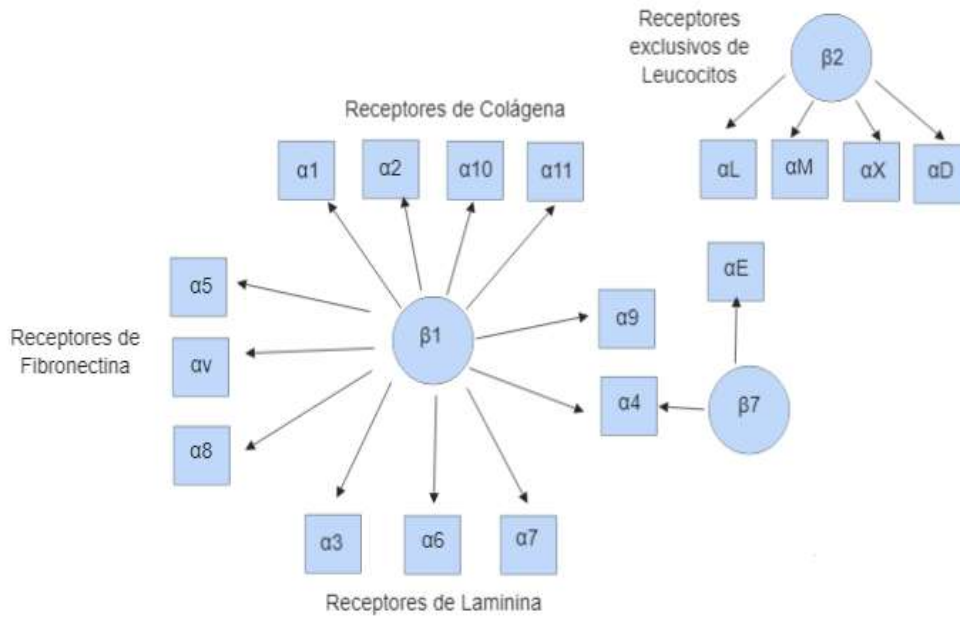


Figura 4. Familia de las integrinas.

Las integrinas son proteínas heterodiméricas alrededor de 30, cuyos dominios citoplásmicos se unen al citoesqueleto. Hay dos subfamilias de integrinas y los miembros de cada familia expresan una cadena β conservada ($\beta 1$ y $\beta 2$) asociadas a diferentes cadenas α . La cadena α tiene un tamaño que oscila entre 120 y 200 kD, mientras que la β varía entre 90 y 110 kD. (modificada de Hynes 2002)

Todas las integrinas presentan la misma estructura básica. La subunidad α está constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas mediante un puente disulfuro. La región extracelular de la subunidad α contiene sitios de unión para cationes divalentes, que son importantes en la unión de la integrina a su ligando. La región extracelular de la subunidad β contiene una región rica en repeticiones de cisteínas. La parte más externa de ambas cadenas tiene una estructura globular y juntas la cadena α y la cadena β forman el sitio de unión a su ligando (Figura 5) (Hynes RO 2004).

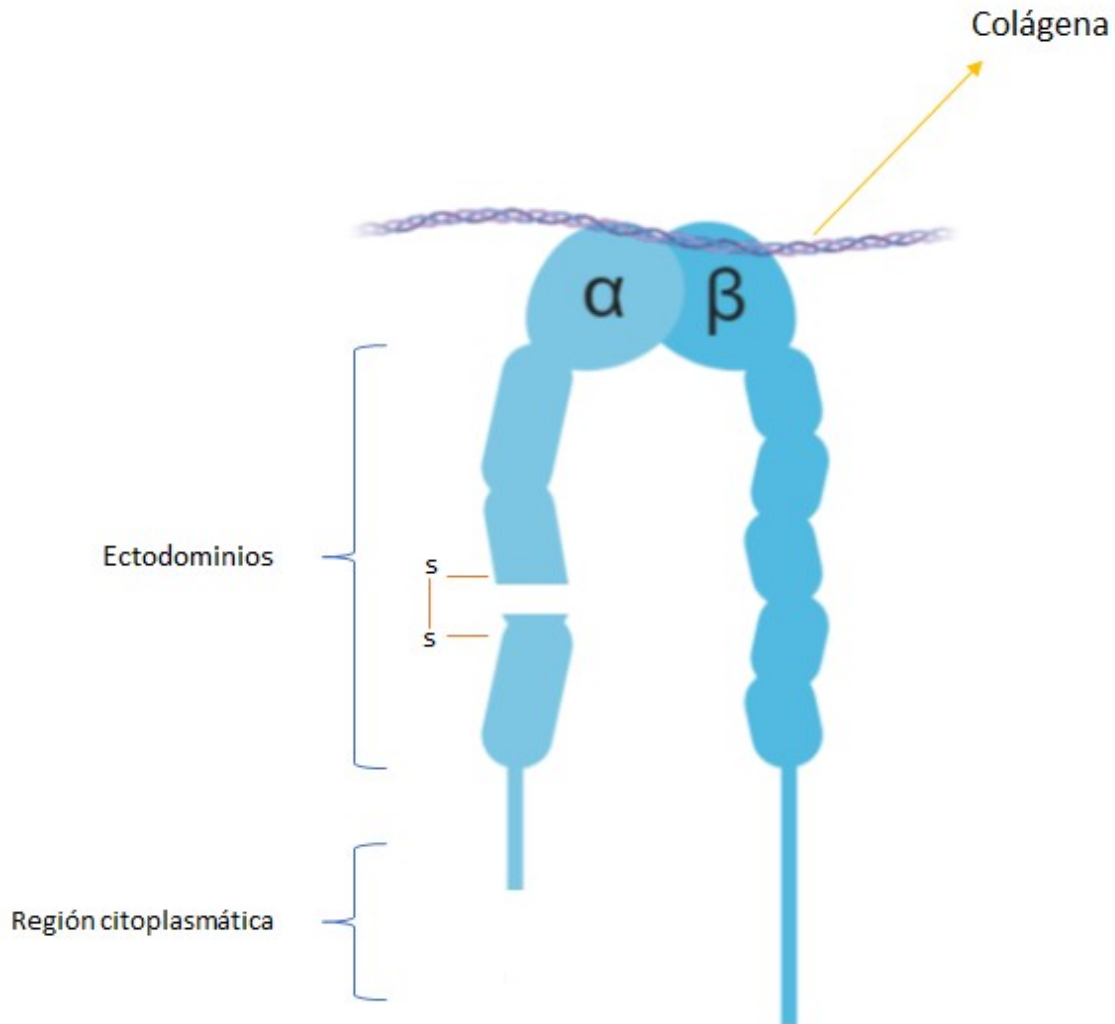


Figura 5. Esquema de la estructura de las subunidades de una integrina. Los extremos aminoterminales de cada cadena forman una cabeza globular que contribuye a la unión entre las cadenas y a la fijación a los ligandos, estas cabezas globulares contienen dominios fijadores de cationes divalentes. Los cationes divalentes son esenciales para la función de las integrinas. Las integrinas se describieron por primera vez como receptores de superficie que interactúan con la matriz extracelular para mandar una señal al citoesqueleto, integrando así el entorno extracelular con el interior de la célula. (modificada de Kechagia et al. 2019)

Estas pueden unirse a sus respectivos ligandos con afinidades variables. Esta propiedad les permite modificar la adhesión de las células a la matriz extracelular o a otras células. La afinidad de las integrinas por su ligando está determinada por el estado conformacional que tienen en un momento dado. Se han identificado tres

estados conformacionales principales que corresponden a diferentes grados de activación de las integrinas: integrina inactiva, integrina con afinidad intermedia e integrina activa. La inactiva posee muy poca afinidad por su ligando y su conformación muestra a la parte externa doblada y muy cerca de la membrana celular (Figura. 6) La que esta con afinidad intermedia puede unirse a su ligando con poca o mediana afinidad y su conformación muestra las cadenas α y β extendidas con las regiones globulares externas (cabezas) levantadas parcialmente (Figura. 6). La activa posee alta afinidad por su ligando y su conformación muestra a la parte externa completamente extendida. Además, en esta conformación la integrina se une en su parte citoplasmática a un conjunto de proteínas que le permiten acoplarse al citoesqueleto de actina y mandar señales al interior de la célula (Bouvard. et al. 2013) (Figura. 5).

Las integrinas son moléculas de señalización bidireccionales únicas que existen en diferentes estados conformacionales que determinan la afinidad del receptor por las proteínas de la matriz extracelular, median las interacciones célula-matriz y célula-célula e integran señales extracelulares al citoesqueleto y las vías de señalización celular. La función de la integrina en la superficie celular está regulada por su cambio de afinidad, de modo que las proteínas intracelulares que interactúan con los dominios citoplásmicos de la integrina aumentan o disminuyen la afinidad de unión integrina-ligando. Está ampliamente aceptado que la activación de la integrina por proteínas específicas es esencial para la adhesión celular y el enlace de la integrina al citoesqueleto de actina, responden a señales intracelulares que modulan su capacidad de enlace. (Bouvard. et al. 2013, Plow et al. 2000, Rosales

2007). Se han identificado tres estados conformacionales principales (ya descritos aquí) que corresponden a diferentes grados de activación de las integrinas: inactiva, con afinidad intermedia y activa. La integrina inactiva posee muy poca afinidad por su ligando y su conformación muestra a la parte externa doblada y muy cerca de la membrana celular. La integrina con afinidad intermedia puede unirse a su ligando con poca o mediana afinidad y su conformación muestra las cadenas α y β extendidas con las regiones globulares externas (cabezas) levantadas parcialmente. La integrina activa posee alta afinidad por su ligando y su conformación muestra a la parte externa completamente extendida. (Bouvard et al. 2013)

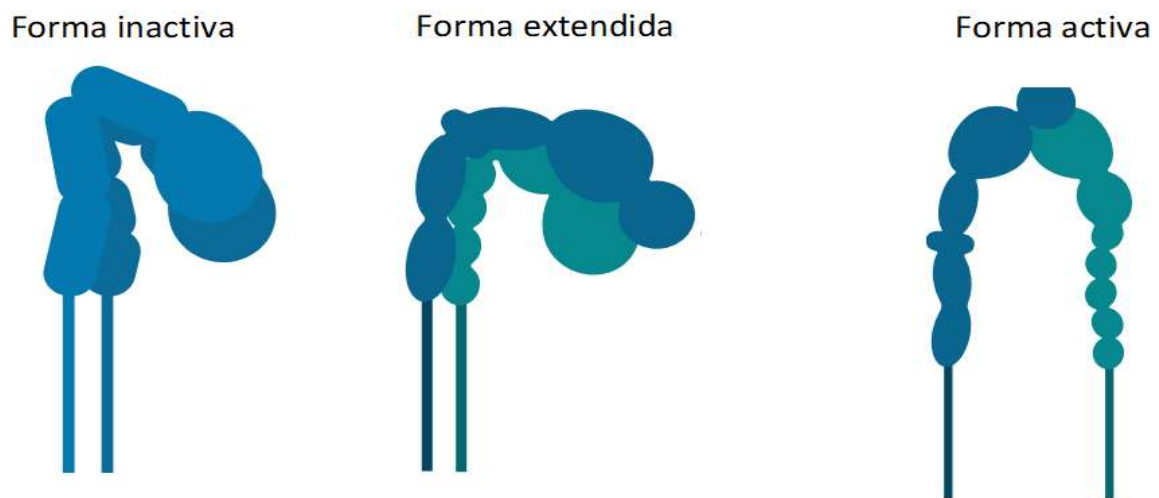


Figura 6. Formas conformacionales de las integrinas. Las integrinas responden a señales intracelulares que modulan su capacidad de enlace (forma inactiva o activa). Modificada de Bouvard et al. 2013

1.6.1 Ligandos de las integrinas

Las integrinas pueden unirse a diferentes ligandos. Principalmente se unen a las proteínas de la matriz extracelular, pero también se unen a moléculas en la membrana de otras células. Es importante resaltar que las integrinas son receptores promiscuos ya que cada integrina puede unirse a más de un ligando y cada ligando puede unirse a más de una integrina (Hynes et al. 1992, Plow et al. 2000) (Tabla 1).

Tabla 1. Integrinas y sus ligandos

Integrina	Ligando
$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 11\beta 1, \alpha 10\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 9\beta 1, \alpha 5\beta 1$	Colágena
$\alpha 3\beta 1, \alpha 4\beta 1, \alpha 5\beta 1, \alpha 8\beta 1, \alpha V\beta 1$	Fibronectina
$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 7\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 9\beta 1, \alpha 10\beta 1$	Laminina
$\alpha V\beta 1, \alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5, \alpha IIb\beta 3, \alpha 8\beta 1$	Vitronectina
$\alpha 5\beta 1, \alpha M\beta 2, \alpha V\beta 3, \alpha X\beta 2, \alpha IIb\beta 3, \alpha V\beta 1$	Fibrinógeno

Tienen un papel muy importante en la adhesión celular, en la polarización de las células inducida por esta adhesión y en la migración celular a través de la matriz extracelular. Además, las integrinas permiten a las células responder a su entorno

químico y físico, a través de detectar el medio de la matriz extracelular y activando vías de señalización hacia el citoesqueleto y otros organelos de la célula (Rosales C. 2007).

1.6.2 Vías de señalización de integrinas

Los estímulos externos que la célula recibe a través de la unión de un ligando particular con una integrina en su membrana se transducen en señales bioquímicas intracelulares que promueven la rearreglos del citoesqueleto de actina y encienden distintas vías de señalización que inducen diferentes respuestas celulares (Mitra et al. 2005). Una vez activa y capaz de provocar la señalización corriente abajo y desencadenar respuestas celulares después del acoplamiento del ligando. Muchas proteínas de la matriz extracelular contienen sitios de reconocimiento de integrinas multivalentes y / o se ensamblan como depósitos de multiproteína o fibrillas en el compartimento extracelular. El consiguiente compromiso de la integrina-ligando (adhesión) y la agrupación en la membrana plasmática proporciona una plataforma para el ensamblaje de complejos multiméricos que provocan la señalización de adhesión corriente abajo (señalización 'de afuera hacia adentro') (Humphries, J 2006). Cuando las integrinas se unen a sus ligandos, se agregan en cúmulos moleculares sobre la membrana de la célula. Estos agregados moleculares se conocen como “adhesiones focales”. Las adhesiones focales son grupos dinámicos de proteínas que ordenan el citoesqueleto y regulan la transducción de señales externas al interior de las células (Mitra et al. 2005). En las adhesiones focales, la cinasa de adhesión focal (FAK) es un componente de señalización crucial que puede influir en el citoesqueleto y a través de diversas conexiones moleculares

puede prender vías de señalización río abajo las GTPasas de la familia Rho y las MAP cinasas (Rosales C. 2007).

1.6.3 Vía de señalización de FAK

La unión de las integrinas con su ligando induce la agregación de las integrinas en la membrana de la célula. Esta agregación de integrinas lleva a la activación de cinasas de tirosinas de la familia Src, las cuales fosforilan a la cinasa FAK para activarla. Posteriormente, FAK también se autofosforila lo cual resulta en una activación completa de esta cinasa (Kleinschmidt y Schlaepfer. 2017, Mitra. et al. 2012). Una vez activa, FAK se une a otras proteínas formando complejos moleculares de señalización. Por ejemplo, la tirosina 925 fosforilada provee un sitio de unión para la región SH2 de la molécula Grb2 (por sus siglas en inglés “growth factor receptor bound-2”). Una vez unida a FAK, Grb2 se puede unir a SOS (por sus siglas en ingles “son of sevenless”) a través de su región SH3. El complejo Grb2/SOS funciona entonces como un factor intercambiador de nucleótidos para la GTPasa Ras. La GTPasa Ras se une a GTP y funciona como un activador de la cinasa de serina/treonina Raf. Raf activada, a su vez activa a la cinasa MEK (“MAPK kinase”). Esta última, es capaz de fosforilar moléculas efectoras como las cinasas ERK I y ERK 2 (por sus siglas en inglés “Extracellular Regulated Kinases I y 2”) (Aplin et al. 1998; Juliano 2002) (Figura 7).

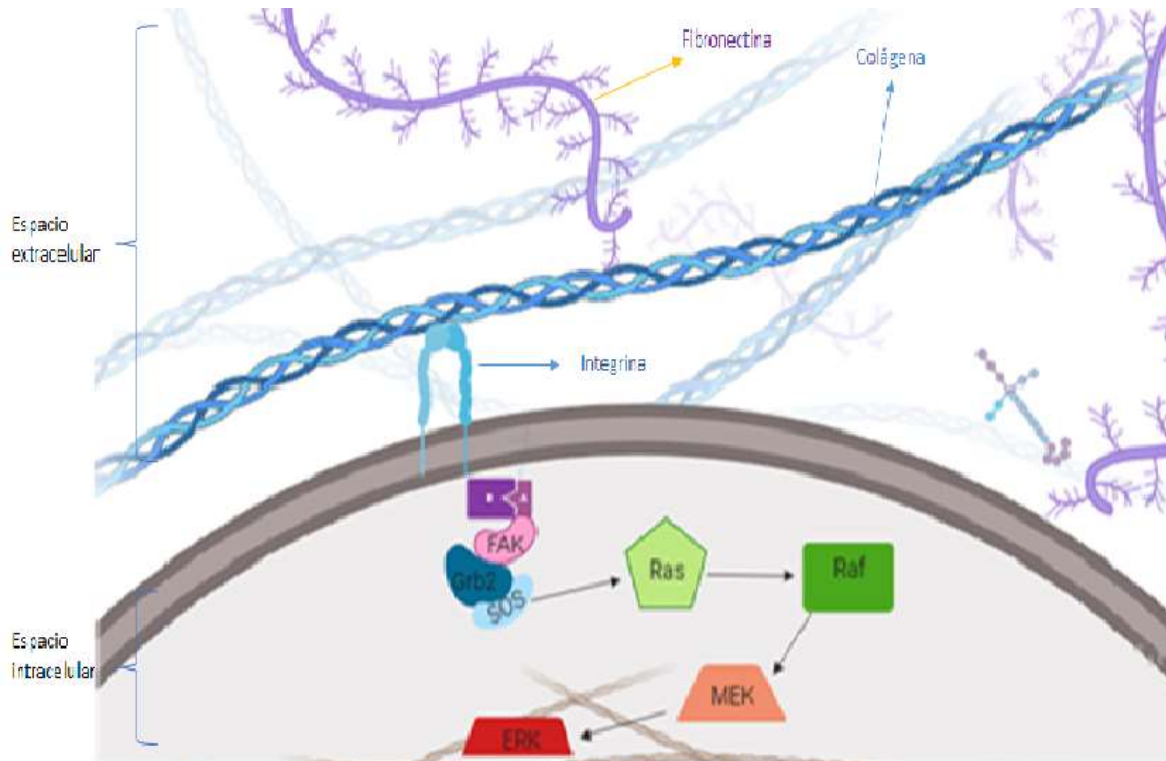


Figura 7. Señalización de integrina para la activación de ERK

Las **vías de la MAP quinasas**, o proteína cinasas activadas por mitógenos es una ruta de transducción de señal de células de eucariotas que se sitúa corriente abajo de los receptores tirosina cinasa. En términos globales, la señal se transporta mediante GRB2 y de Sos a Ras (una proteína G monomérica). Estando Ras, ya activada, estimula a tres proteínas quinasas que actúan de forma secuencial y que culmina con la activación de ERK, que es capaz de traslocarse al núcleo para, allí, regular la transcripción modificando la actividad de proteínas. (modificada Schlaepfer et al. 1999. Lawson et al. 2012)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El agrandamiento gingival inducido por medicamentos es una enfermedad donde la encía crece sin control, como un efecto secundario al uso de ciertos medicamentos. Este agrandamiento gingival es en la mayoría de los casos provocado por un incremento de la matriz extracelular, principalmente colágena. No se tiene muy

claro si el fibroblasto se encuentra alterado y a su vez las funciones que desempeñan los fibroblastos gingivales además del mantenimiento de la matriz extracelular, estas pueden estar alteradas en humanos que toman algún medicamento relacionado con el agrandamiento gingival. En este trabajo se investigó si la expresión de integrinas y funciones relacionadas a estos receptores como la adhesión y la migración celular se alteran en fibroblastos gingivales de individuos con agrandamiento gingival.

3. HIPÓTESIS

La expresión de integrinas, que funcionan como receptores para colágena y fibronectina, se encuentra alterada en los fibroblastos de encía de pacientes tratados con nifedipina los cuales presentan agrandamiento gingival y esto a su vez puede estar alterando la adhesión y migración de los fibroblastos de encía de pacientes tratados con nifedipina y que presentan agrandamiento gingival.

4. OBJETIVO GENERAL

Comparar la expresión de integrinas de la familia $\beta 1$ en fibroblastos gingivales obtenidos de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina y en fibroblastos gingivales obtenidos de individuos sanos para analizar la adhesión y migración sobre sustratos de colágena y fibronectina.

4.1 Objetivos particulares

- Cultivar fibroblastos gingivales derivados de encía sana y de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina.
- Evaluar la expresión de integrinas en fibroblastos gingivales derivados de encía sana y de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina.
- Evaluar la adhesión y migración de fibroblastos gingivales derivados de encía sana y de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina sobre colágena y sobre fibronectina.
- Evaluar si la vía de las MAPK cinasas se encuentra activada en fibroblastos gingivales derivados de encía sana y de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina.

5. METODOLOGÍA.

Se utilizaron fibroblastos gingivales derivados de encía de un paciente con agrandamiento gingival inducido por nifedipina y un derivado de encía de donador sano. Los fibroblastos fueron donados por la Dra. Eileen Uribe Querol (Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México). La encía de donde se obtuvieron las muestras fue donada bajo consentimiento informado, por los pacientes con agrandamiento gingival que requerían de una cirugía (gingivectomía) y por un individuo sano, el procedimiento por el cual se obtuvieron los fibroblastos se detalla en el anexo de esta tesis. Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo con

medio DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) marca Gibco (Grand Island, NY), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 20 mM L-Glutamina. Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

5.1 Expresión de Integrinas

Para conocer qué tipo de integrinas se expresan en fibroblastos de encía de individuos sanos y de pacientes con agrandamiento gingival, los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos monoclonales específicos contra cada tipo de integrina y se analizaron por citometría de flujo. El procedimiento fue el siguiente: 3x10⁶ fibroblastos se incubaron con 10 µg/mL de cada uno de los anticuerpos monoclonales siguientes durante 1 h a 4 °C

Anticuerpo monoclonal (mAb) P1E6 contra integrina α₂ (número de catálogo ab24697), mAb P1B5 contra integrina α₃ (número de catálogo ab24696), mAb P4G9 contra integrina α₄ (número de catálogo ab78453), mAb P1D6 contra integrina α₅ (número de catálogo ab75472), mAb VNR 147 contra integrina α_v (número de catálogo ab78289j), mAb TS2/16 contra integrina β₁ (número de catálogo sc-53711), fragmento F(ab')₂ de anticuerpos de cabra contra IgG de ratón, acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (número de catálogo sc-3699), todos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.).

Se tomaron alícuotas anti-integrina (10µg/mL) (β₁, α₁, α₂, α₃, α₄, α₅, α₆ y α_v) y se colocaron en las muestras de fibroblastos a una concentración final de 3x10⁶ cel/mL, se incuban en hielo por 1 hora. Los fibroblastos se lavaron tres veces con 1 mL de

amortiguador para FACS (PBS + 0.5 % albúmina de suero bovino + 1 % sucrosa) frío. Posteriormente, los fibroblastos se le añadió 20 μ L de anticuerpo F(ab')₂ anti-IgG de ratón conjugado con FITC y se incubaron a una dilución 1/400 durante 30 min a 4 °C. Después, los fibroblastos se lavaron tres veces con 1 ml de amortiguador para FACS frío. Finalmente, los fibroblastos se resuspendieron en 400 μ l de 1 % paraformaldehído en PBS frío. Los fibroblastos se guardaron protegidos de la luz a 4 °C hasta su lectura en un citómetro de flujo FACScan.

5.2 Ensayos de adhesión

Placas de cultivo de 96 pozos fueron recubiertas con 10 μ g/mL colágena (Colágena tipo I de cola de rata, Millipore número de catálogo 92590), 10 μ g/mL fibronectina (fibronectina de plasma humano, Roche número de catálogo 11080938001), o 1 % BSA en 0.1 M NaHCO₃ estéril 50 μ L cada una durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente, las placas se lavaron con 100 μ L por pozo de PBS y se bloquearon con 300 μ L / pozo de 1 % BSA en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Después de eliminar la albúmina, 1 x10⁴ fibroblastos resuspendidos en 1 % de BSA en PBS, se colocaron en cada pozo y se incubaron durante dos horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Posterior a la incubación, la placa se lavó cuidadosamente con 100 μ L / pozo de PBS. Los fibroblastos adheridos se tiñeron con 50 μ L/pozo de 0.5% cristal violeta disuelto en 20 % metanol en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la placa se lavó con 100 μ L / pozo de agua destilada y los fibroblastos teñidos se disolvieron en 100 μ L / pozo de 1 %

SDS. Inmediatamente después, la absorbancia a 590 nm se leyó en un lector de placas modelo Synergy HT (marca: Bio-Tek).

5.3 Ensayos de herida

5.3.1 Preparación de placa de cultivo.

Placas de cultivo de 12 pozos fueron recubiertas con 500 μ L de 10 μ g/mL colágena (Colágena tipo I de cola de rata, Millipore número de catálogo 92590), 10 μ g/mL fibronectina (fibronectina de plasma humano, Roche número de catálogo 11080938001), o 1% BSA en PBS estéril durante 3 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo la placa se colocó en el cuarto frío a 4 °C durante toda la noche.

5.3.2 Cultivo celular

En cada uno de los pozos de la placa de 12 pozos recubierto de colágena, fibronectina o albúmina, se sembraron 2×10^5 fibroblastos resuspendidos en 1 mL de medio de cultivo. La placa se incubó a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta que los fibroblastos llegaron a confluencia.

5.3.3 Herida

En condiciones de esterilidad, con una punta de micropipeta de 200 μ L estéril, se realizó una “herida” vertical a través de la monocapa de fibroblastos. Para esto, se presiona firmemente contra la parte superior de la placa de cultivo y se raspa la monocapa de células en un solo movimiento rápido. En seguida se retiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur conectada al vacío y se agregaron 700 μ L de medio de cultivo lentamente por las paredes del pozo. Se inspeccionó la herida en

el microscopio tomando una fotografía inicial. La placa de cultivo se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Se tomaron fotografías cada 24h de la placa en un periodo de 48 h.

5.4 Estimulación de fibroblastos por adhesión

Se colocaron 2×10^5 fibroblastos en 1 mL de PBS de sobre cada pozo de una placa de cultivo de 12 pozos, previamente recubierto con colágena, fibronectina o albúmina. La placa se dejó en la incubadora a 37 °C con 5% de CO₂ durante 30 min para que los fibroblastos se adhieran a la placa. Pasado el tiempo se raspa el pozo y se recuperan los fibroblastos en tubos polipropileno de 1.5 mL (marca Eppendorf) nuevos.

5.4.1 Extracción de proteínas totales de fibroblastos

Los fibroblastos en un tubo polipropileno de 1.5 mL (marca Eppendorf) se centrifugaron a 5000 rpm en una microcentrífuga y después de eliminar el sobrenadante, se lisaron con 60 µl de amortiguador de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) al cual se le añadió previamente inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail) según especificaciones del proveedor de inhibidores de fosfatasa Thermo Scientific Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail). Las células se incubaron en amortiguador de lisis durante 15 min en hielo. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 14 000 rpm en una microcentrífuga para eliminar restos celulares insolubles. El sobrenadante se recuperó en tubos polipropileno de 1.5 mL (marca Eppendorf) nuevos.

5.4.2 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo con las especificaciones del manual de preparación de minigeles Bio-Rad. Los lisados de fibroblastos (20 μ L) se mezclaron con amortiguador de carga (10 μ L) y se hirvieron durante 5 min, antes de cargarlos en los geles de poliacrilamida. La electroforesis se corrió a una corriente constante 50 mA / gel, durante 1 h y 15 min.

5.4.3 Western blot

Las proteínas de los fibroblastos resueltas en la electroforesis se transfirieron a una membrana PVDF a 500 mA durante 1h. Posteriormente, la membrana se bloqueó con 3% BSA y 0.5% Tween-20 en TBS (solución salina 150 mM Tris 20 mM, pH 7.4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después la membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-ERK fosforilada (número de catálogo sc-7383) de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1/3000 o anti-ERK total (anti-ERK K-23 rabbit polyclonal IgG número de catálogo sc-271269) a una dilución de 1/2000 durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la membrana se lavó 5 veces con TTBS (Solución salina 15 mM amortiguadora con Tris 20 mM y Tween 20 al 0.1% pH 7.4) durante cinco min cada lavado. Posteriormente la membrana se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo (para ERK total) acoplado a HRP (número de catálogo 55686) de ICN-Cappel, a una dilución de 1/3000, o con un anticuerpo anti-IgG de ratón (para p-ERK) acoplado a HRP (número de catálogo 516102) de ICN-Cappel Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1/3000 durante una 1h a temperatura ambiente. La membrana se lavó cinco veces con TTBS durante cinco min cada lavado y finalmente se reveló con el reactivo de quimioluminiscencia (EMD

Millipore Sustrato de HRP quimioluminiscente Western Immobilon [ECL]) y exponiendo la membrana a una película fotográfica (película radiográfica sensible al azul, Marca Juama S.A.)

6. RESULTADOS

6.1 Expresión de integrinas en fibroblastos de encía

Los fibroblastos son las células encargadas de sintetizar y mantener la matriz extracelular y reconocen a las proteínas de la matriz extracelular a través de los receptores integrinas, exploramos si existen diferencias entre la expresión de integrinas en los fibroblastos de encía de individuos sanos y en los fibroblastos de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina. Los fibroblastos de encía sana (Control) mostraron el mismo nivel de expresión de la cadena $\beta 1$ de integrinas que los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (Figura 8).

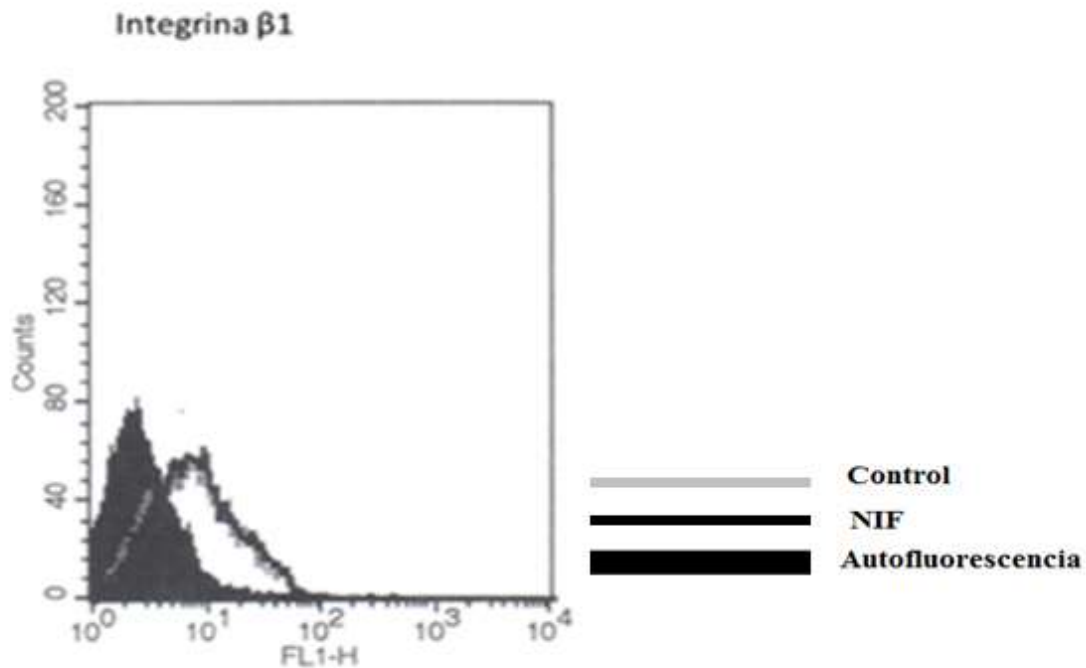


Figura 8. Expresión de integrinas $\beta 1$ en fibroblastos de encía. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos contra la cadena $\beta 1$ de integrinas y analizados por citometría de flujo. Los fibroblastos de encía sana (Control) se muestran en la línea gris) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) se muestran en la línea negra, el histograma negro representa la autofluorescencia.

Aunque no se observó diferencias en la expresión de la cadena $\beta 1$ de las integrinas, es posible que existen diferencias en alguna de las integrinas que comparten la cadena $\beta 1$. Por tanto, exploramos la expresión de la cadena alfa de varias integrinas de la familia $\beta 1$ que se sabe participan en el reconocimiento de las proteínas de matriz extracelular. Los fibroblastos de encía sana (Control) mostraron el mismo nivel de expresión de la cadena $\alpha 1$ de integrinas que los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (Figura 9).

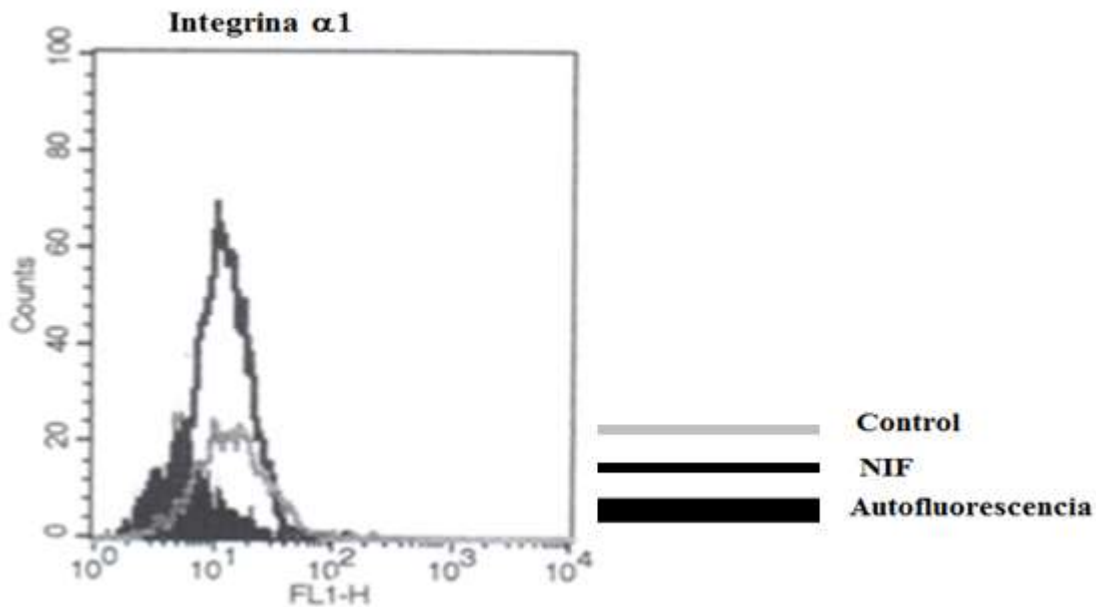


Figura 9. Expresión de integrinas $\alpha 1$ en fibroblastos de encía. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos contra la cadena $\alpha 1$ de integrinas y analizados por citometría de flujo. Fibroblastos de encía sana (Control) (línea gris), fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (línea negra). El histograma negro representa autofluorescencia de los fibroblastos.

A diferencia de la cadena $\alpha 1$, la expresión de las integrinas $\alpha 2$ se encontró disminuida en los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (Figura 10). En forma opuesta la expresión de las integrinas $\alpha 3$ fue mayor en los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina con respecto a los fibroblastos de encía de individuos sanos (Figura 10).

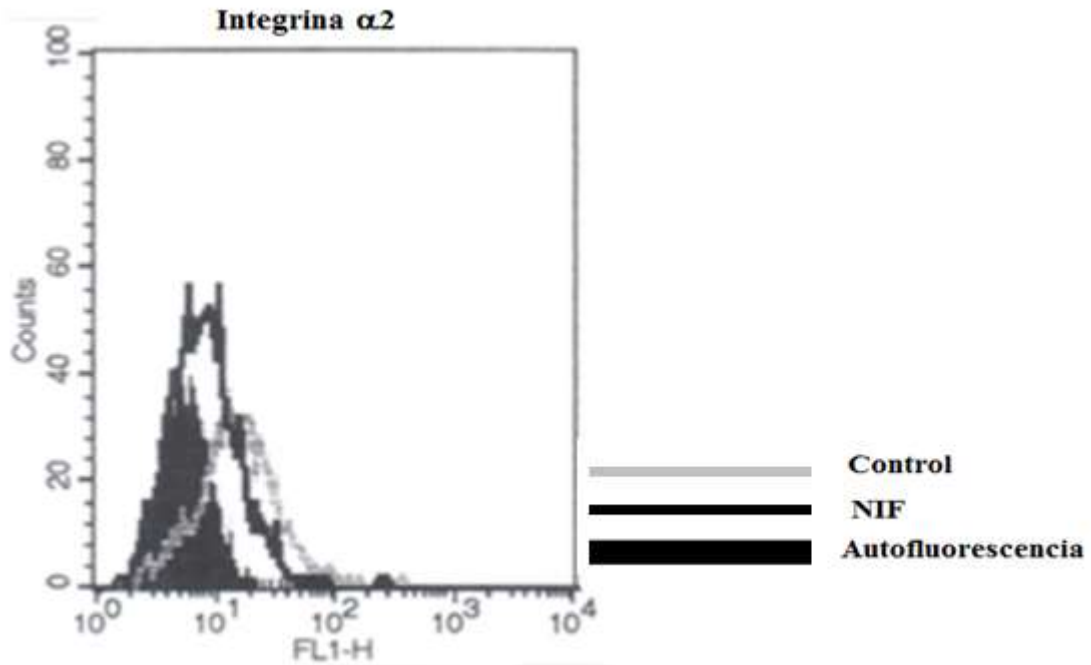


Figura 10. Expresión de integrinas $\alpha 2$ en fibroblastos de encía. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos contra la cadena $\alpha 2$ de integrinas y analizados por citometría de flujo. Fibroblastos de encía sana (Control) (línea gris) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (línea negra). El histograma negro representa la autofluorescencia de fibroblastos.

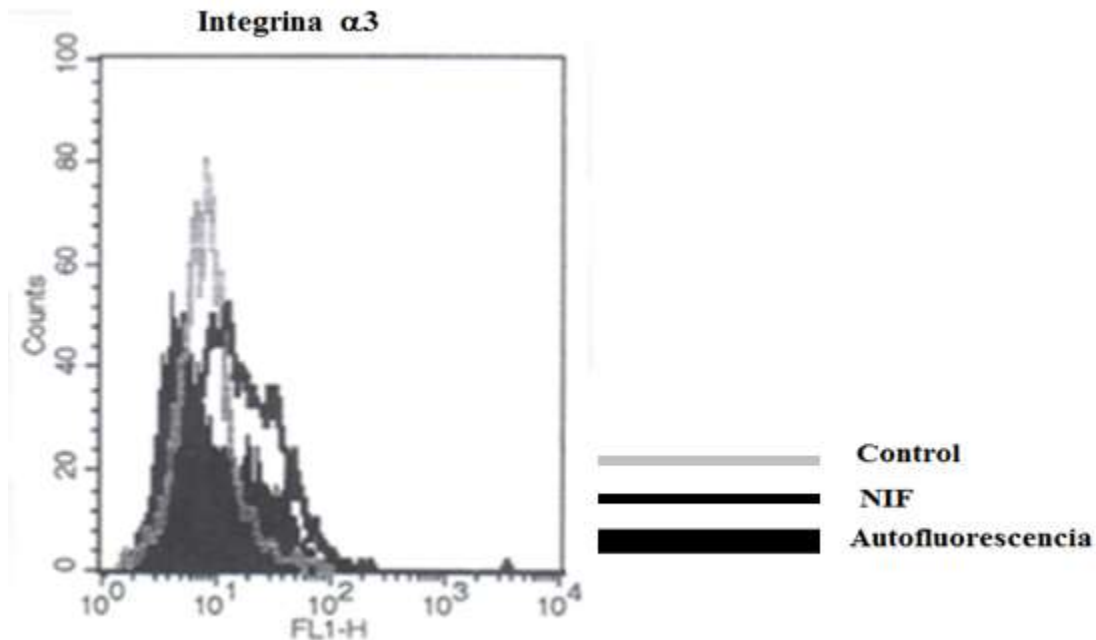


Figura 11. Expresión de integrinas $\alpha 3$ en fibroblastos de encía. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos monoclonales contra la cadena $\alpha 3$ de integrinas y analizados por citometría de flujo. Fibroblastos de encía sana (Control) (línea gris), fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (línea en negra fondo blanco). El histograma negro representa la autofluorescencia de fibroblastos.

Al analizar las otras cadenas alfa, tampoco encontramos diferencias entre los diferentes fibroblastos. Los fibroblastos de encía sana mostraron el mismo nivel de expresión de la cadena $\alpha 5$ de integrinas (Figura 12) y de la cadena $\alpha 6$ de integrinas (Figura 13) que los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina.

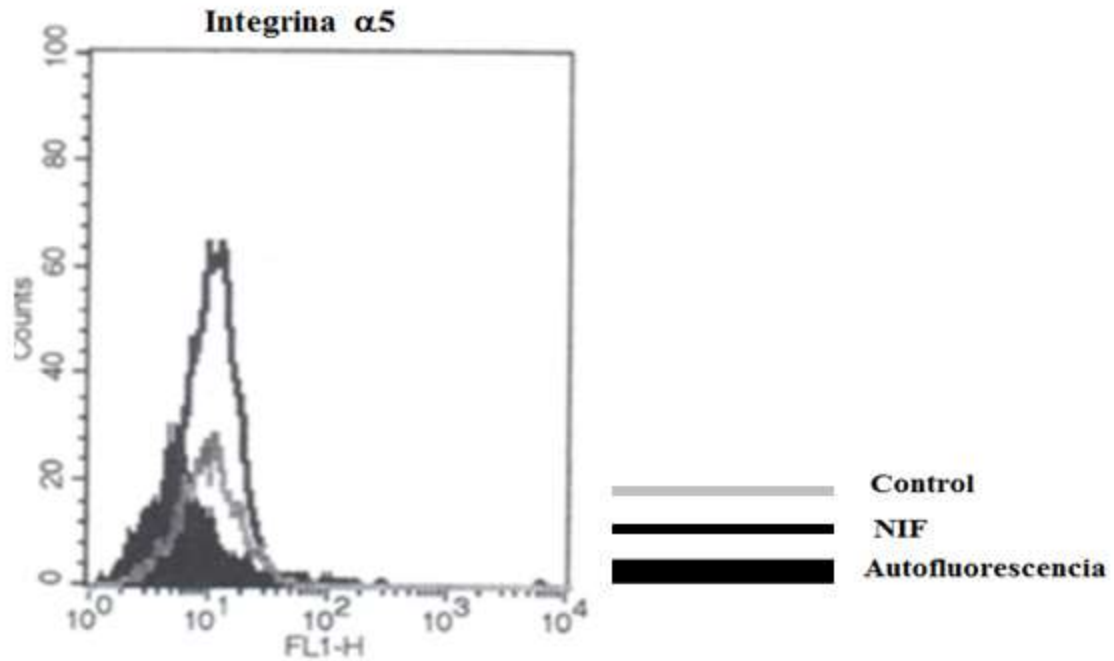


Figura 12. Expresión de integrinas $\alpha 5$ en fibroblastos de encía. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos monoclonales específicos contra la cadena $\alpha 5$ de integrinas y analizados por citometría de flujo. Fibroblastos de encía sana (Control) (línea gris) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (línea negra). El histograma negro representa la autofluorescencia de los fibroblastos.

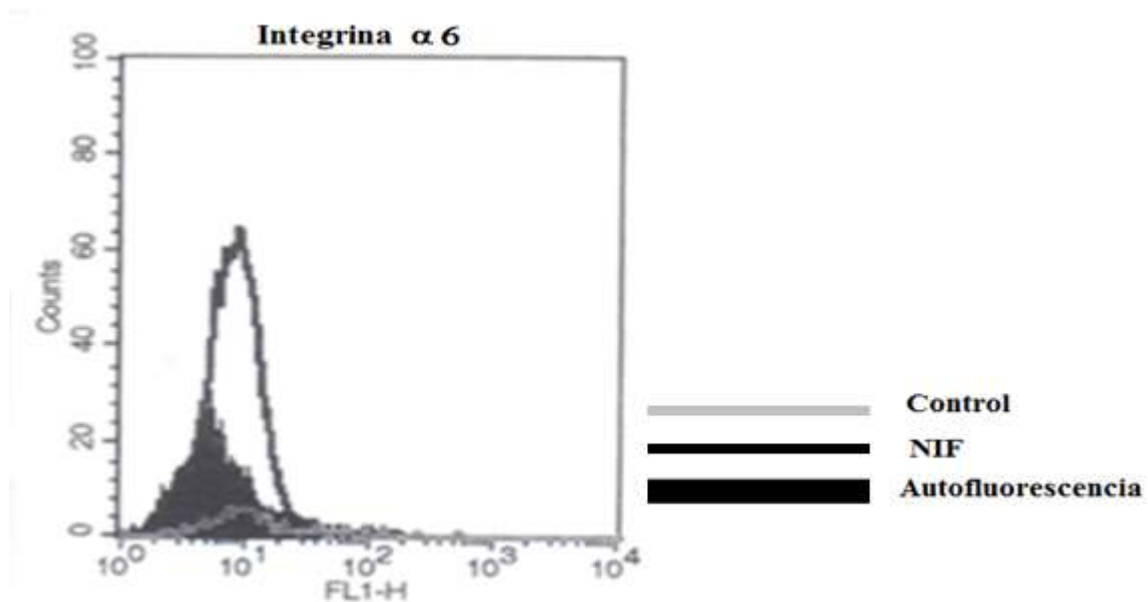


Figura 13. Expresión de integrinas $\alpha 6$ en fibroblastos de encía. Los fibroblastos fueron teñidos con anticuerpos contra la cadena $\alpha 6$ de integrinas y analizados por citometría de flujo. Fibroblastos de encía sana (Control) (línea gris), fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (línea negra). El histograma negro representa la autofluorescencia de los fibroblastos.

En conclusión, existen diferencias en la expresión de integrinas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en los fibroblastos de pacientes que tomaron nifedipina en comparación a los fibroblastos de personas sanas.

6.2 Los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina tienen mayor adhesión a colágena y a fibronectina.

La diferencia de expresión de las integrinas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ entre los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina y los fibroblastos de encía sana, sugiere que las funciones de adhesión y migración de los fibroblastos pueden estar alteradas en la encía con agrandamiento. Para evaluar esta posibilidad,

determinamos el grado de adhesión de los fibroblastos tanto a colágena como a fibronectina. Los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) tuvieron mayor adhesión a colágena y también a fibronectina que los fibroblastos de encía sana (Figura. 14).

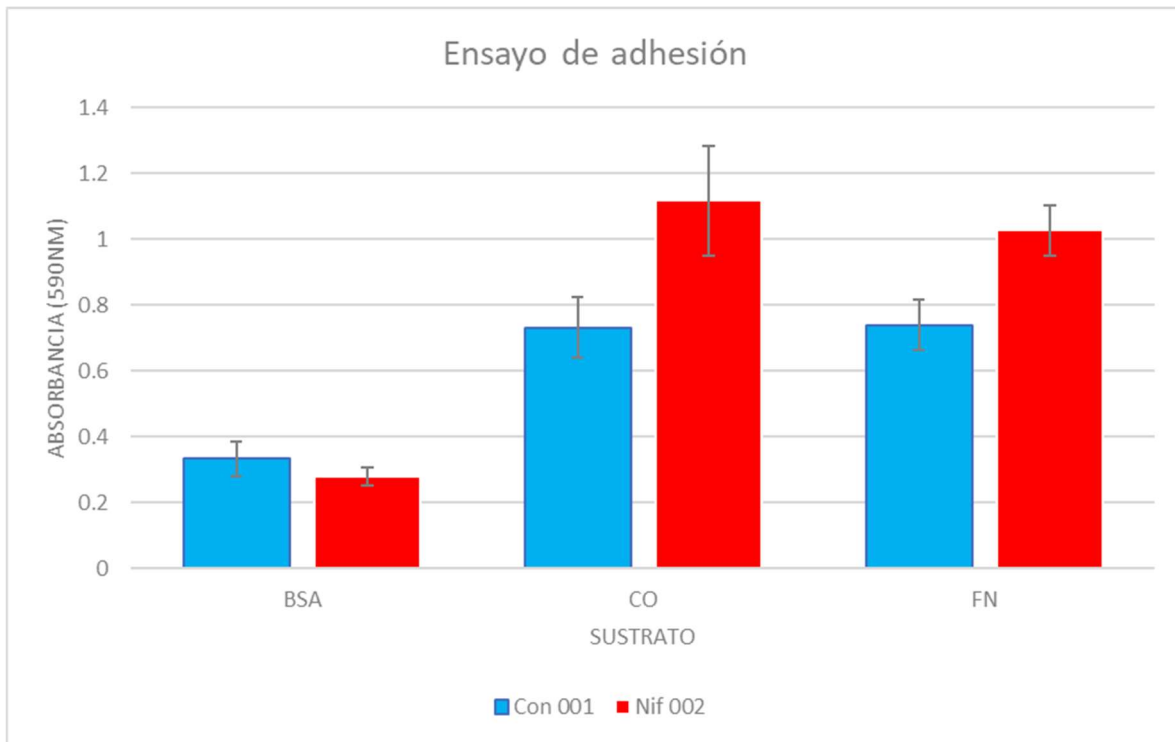


Figura 14. Fibroblastos de encía sana (Control) (barras azules) o fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) (barras rojas) se colocaron sobre albúmina (BSA), sobre colágena (CO) o sobre fibronectina (FN) y se incubaron por 2 h. Posteriormente, las células adheridas se tiñeron con cristal violeta y la absorbancia del colorante se detectó en un lector de placas a 590 nm. Los datos son el promedio \pm desviación estándar de cinco repeticiones por tratamiento.

Estos resultados sugieren que la alteración en la expresión de integrinas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ lleva a una mayor adhesión de los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina tanto a colágena como a fibronectina.

6.3 Los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina presentan menor migración sobre colágena y sobre fibronectina.

Para explorar si la diferencia en la expresión de integrinas también se relaciona con una diferencia en la migración de los fibroblastos gingivales sobre colágena y sobre fibronectina, realizamos ensayos de herida con las células sobre estas proteínas de la matriz extracelular. Los fibroblastos fueron cultivados en cajas de 12 pozos hasta confluencia, se colocaron 3×10^5 fibroblastos por cada pozo (Figura 15) y posteriormente se realizó una herida con una punta de micropipeta de 200 μ l. La zona de "herida" donde no hay células se observó al microscopio durante 48 horas para ver como los fibroblastos migran sobre las proteínas de colágena y fibronectina.

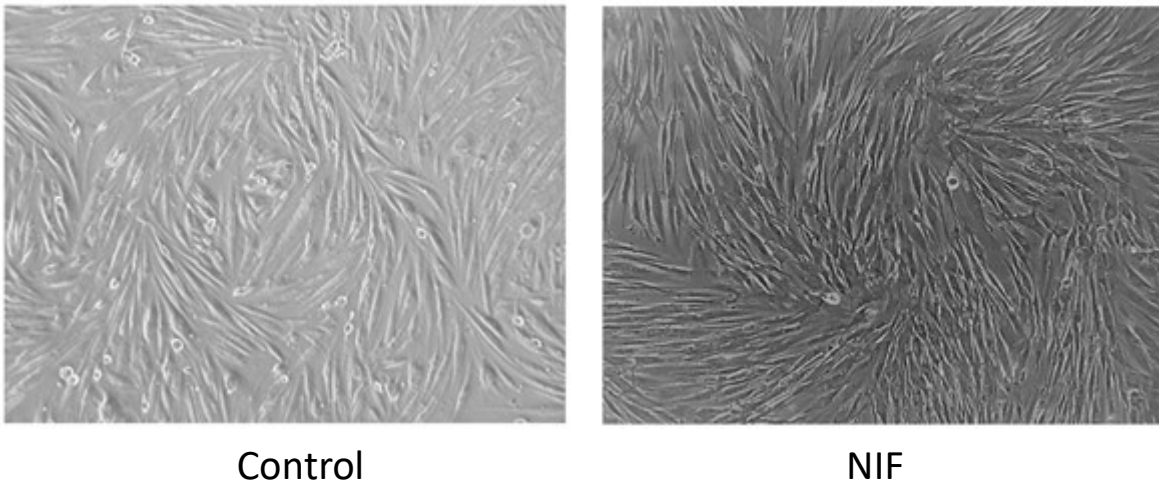


Figura 15. Migración de fibroblastos. Fibroblastos de encía sana (Control) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) en cultivos confluentes.

El tiempo 0 h representa el inicio de la herida. La migración de los fibroblastos de encía sana (Control) sobre albúmina (BSA) fue lenta ya que a las 24 h todavía la herida no se llenaba con células (Figura 16). Para las 48 h, los fibroblastos CO ya habían llenado la herida (Figura 16). Por el contrario, los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) mostraron una migración aún más lenta. A las 24 h la herida casi se ve igual que la herida inicial (Figura 16) y a las 48 h todavía la herida no se llena con células (Figura 16).

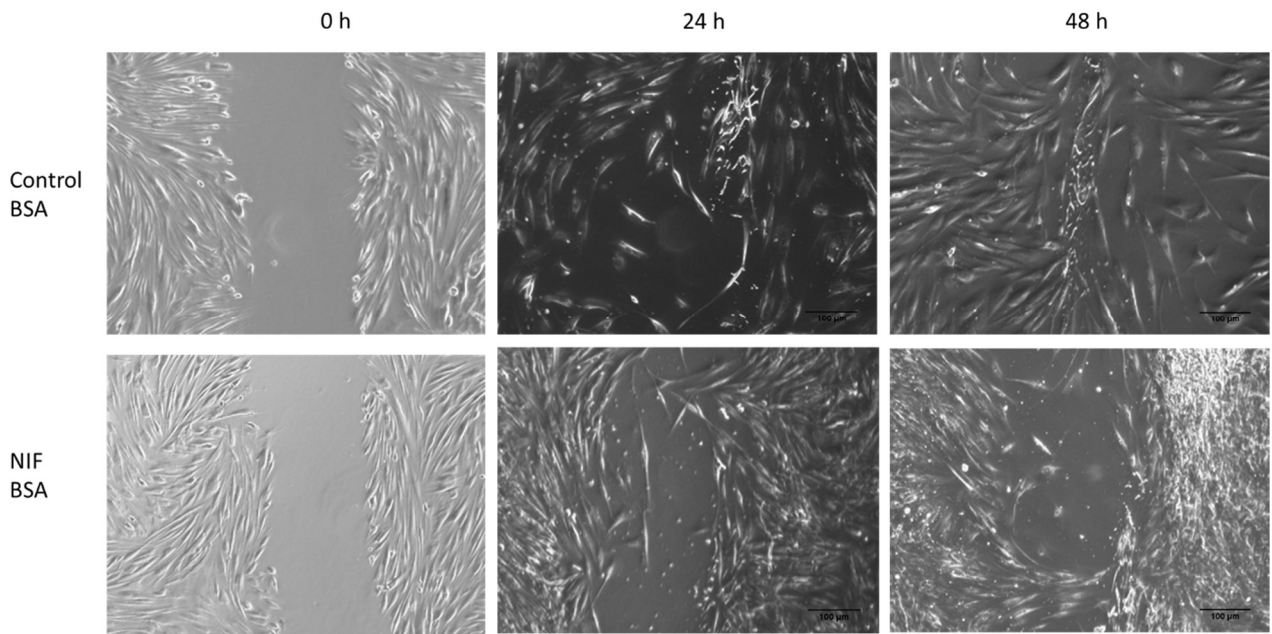


Figura 16. Cultivos confluentes de fibroblastos sobre albumina. Fibroblastos de encía sana (Control) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF). Los fibroblastos fueron raspados con una punta de micropipeta de 200 µl creando una herida (0 h). La herida se realizó a las 24 h y 48 h de cultivo para observar la migración de los fibroblastos en la zona sin células.

De forma comparable, cuando se analizan la migración los fibroblastos Control contra NIF tuvieron una migración más lenta sobre colágena que los fibroblastos Control. A las 24 h ambos tipos de fibroblastos tienen una migración comparable,

pero a las 48 h claramente los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina tienen espacio alrededor sin haber terminado de llenar la herida (Figura 17), mientras que los fibroblastos de encía sana ya habían cubierto toda la herida (Figura 17).

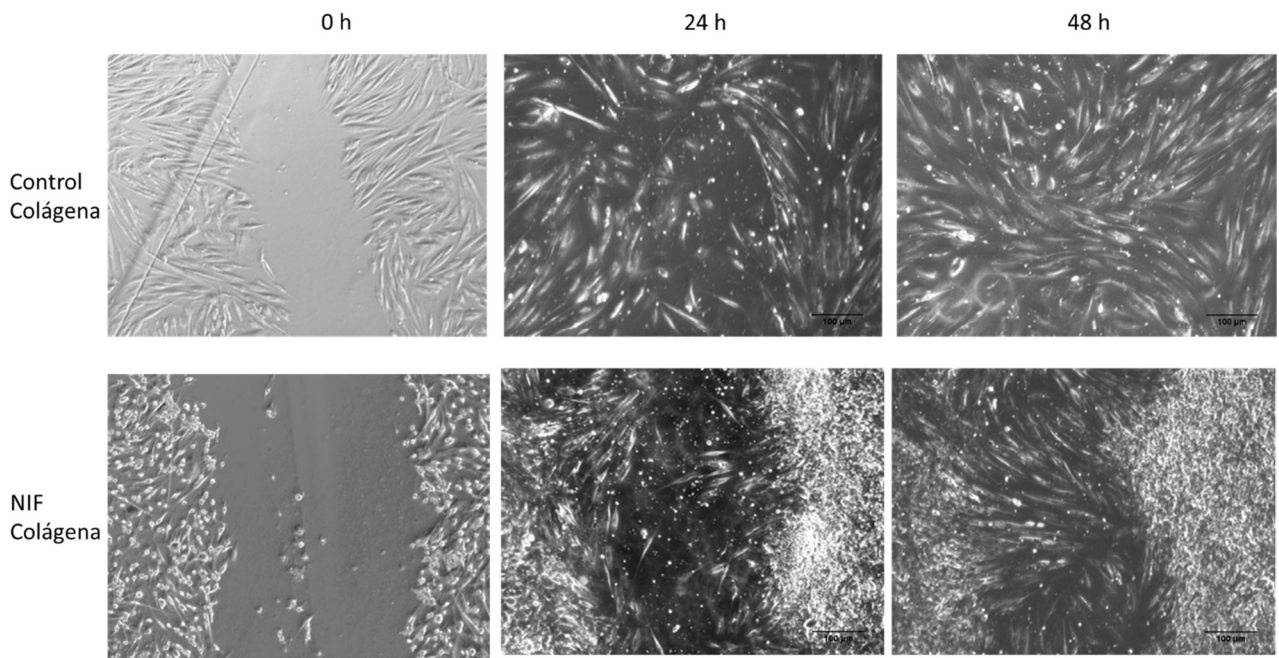


Figura 17. Cultivos confluentes de fibroblastos sobre colágena Fibroblastos de encía sana (Control) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) fueron raspados con una punta de micropipeta de 200 µl creando una herida (0 h). La herida se realizó a 24 h y 48 h de cultivo para observar la migración de los fibroblastos en la zona sin células.

Cuando los fibroblastos se cultivaron sobre fibronectina se observó un comportamiento similar. A las 24 h de cultivo los fibroblastos de encía sana ya casi habían llenado la herida (Figura 18), mientras que los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina habían migrado muy poco en la zona de la herida (Figura 18). Para las 48 h de cultivo, los fibroblastos Control ya habían llenado la herida (Figura 18), y fibroblastos NIF todavía presentaban espacios (Figura 18).

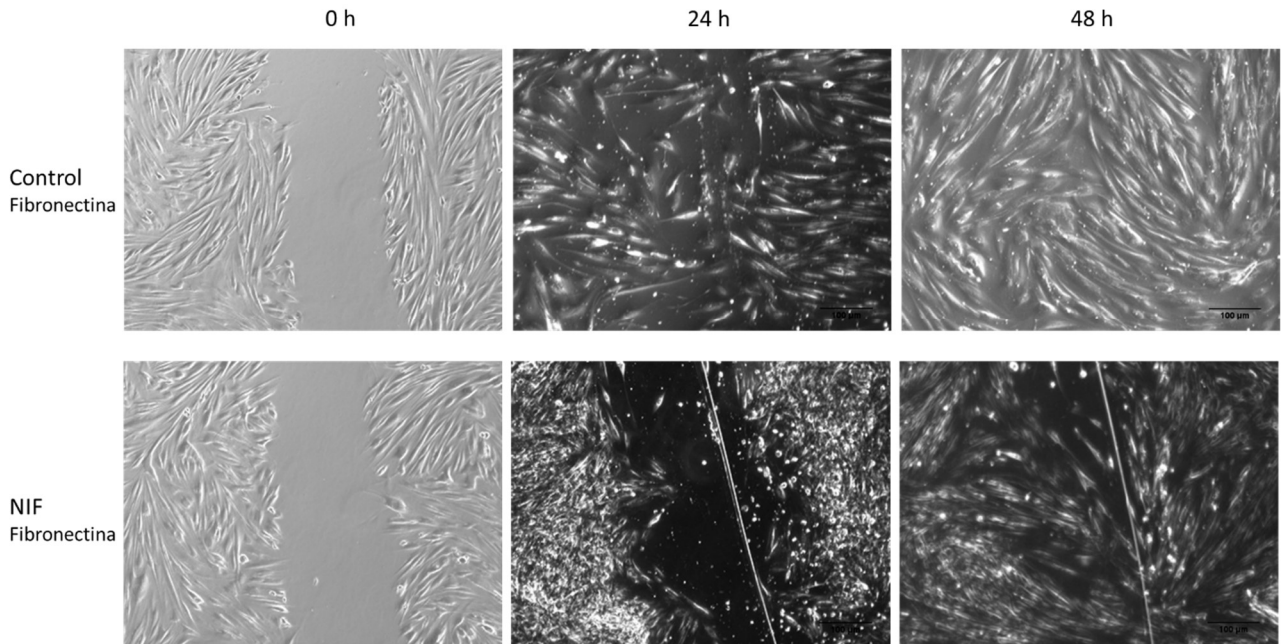


Figura 18. Cultivos confluentes de fibroblastos sobre fibronectina. Fibroblastos de encía sana (Control) y fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina (NIF) fueron raspados con una punta de micropipeta de 200 μ l creando una herida (0 h). La herida se realizó a 24 h y 48 h de cultivo para observar la migración de los fibroblastos en la zona sin células.

Estos resultados sugieren que la función de migración se ve alterada cuando están sometidos a sustratos de colágena y fibronectina en los fibroblastos NIF ya que presentan una menor migración que la de los fibroblastos de encía sana (Control).

6.4 Señalización por integrinas en fibroblastos gingivales.

Los experimentos anteriores sugieren que existen diferencias en la expresión de integrinas en los fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina lo que pueden llevar a diferencias tanto en la adhesión como de migración de los fibroblastos. Se buscó entonces posibles diferencias en la señalización que las integrinas pueden enviar al interior de las células cuando los fibroblastos

gingivales reconocen colágena o fibronectina. Una de las vías de señalización que las integrinas pueden activar es la vía de las MAP cinasas. En particular la activación de la ERK cinasa interacciona con la activación de integrinas (Huang C et al 2004). Para detectar la activación de la ERK cinasa, se utilizó la técnica de Western blot con anticuerpos específicos que reconocen la forma fosforilada (activada) de la ERK cinasa. Cuando los fibroblastos Control se colocaron sobre albúmina encontramos que la cinasa ERK ya estaba fosforilada (Figura 19), indicando que la ERK cinasa se encuentra activada en los fibroblastos Control de igual forma cuando se colocaron los fibroblastos Control sobre colágena, la activación de ERK cinasa es similar a los de albumina (Figura 19). Sin embargo, cuando los fibroblastos que se colocaron sobre fibronectina, expreso una menor cantidad de ERK cinasa fosforilada con respecto a los fibroblastos sobre albúmina (Figura 19). Esto indica que la vía de las cinasas MAP es utilizada por los fibroblastos gingivales de encía sana dependiendo del sustrato al que se mantengan.

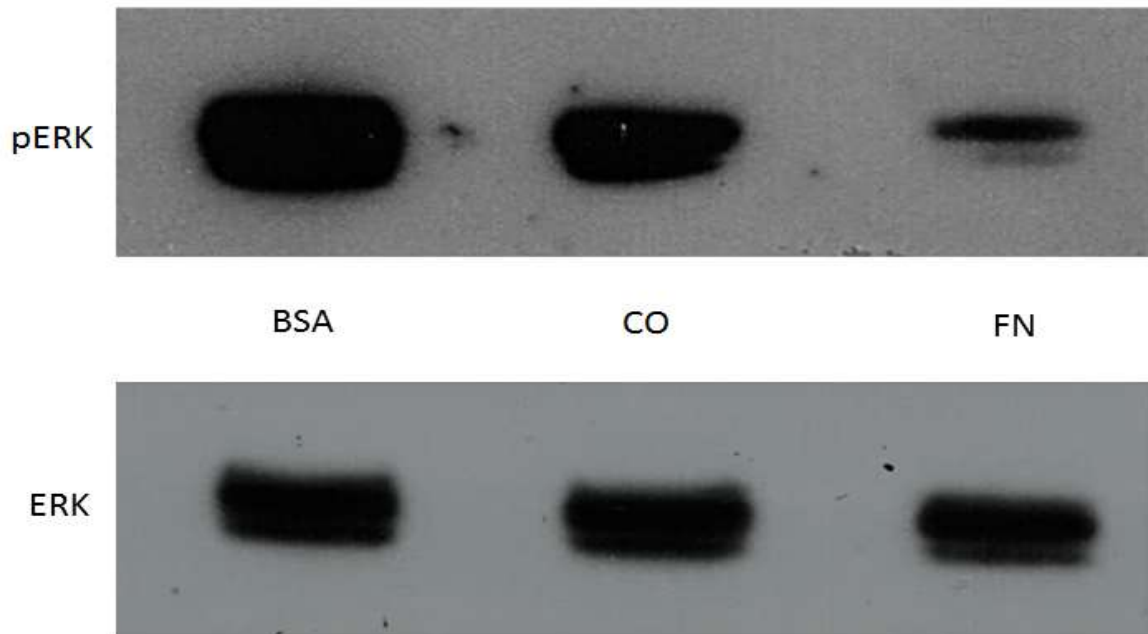


Figura 19. Activación de pERK y ERK. Fibroblastos de encía de individuos sanos se colocaron sobre albúmina (BSA), sobre colágena (CO) o sobre fibronectina (FN) y se dejaron adherir por 30 min. Posteriormente, los fibroblastos se recuperaron y lisaron para preparar extractos de proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF para ser probadas con anticuerpos anti ERK fosforilada (pERK) o anticuerpos contra ERK total (ERK).

Algo similar sucedió a los fibroblastos NIF en comparación a los fibroblastos Control. Los fibroblastos NIF ya presentaban la ERK cinasa fosforilada cuando se encuentran en sustrato de albumina (BSA) (Figura 20). Al comparar los fibroblastos en los tres sustratos albumina, colágena y fibronectina vemos que son similares, los que nos indica que posiblemente no estamos viendo la activación de la ERK cinasa por los sustratos, sino más bien porque los fibroblastos NIF ya presentan la cinasa activa antes de someterlos a los sustratos.

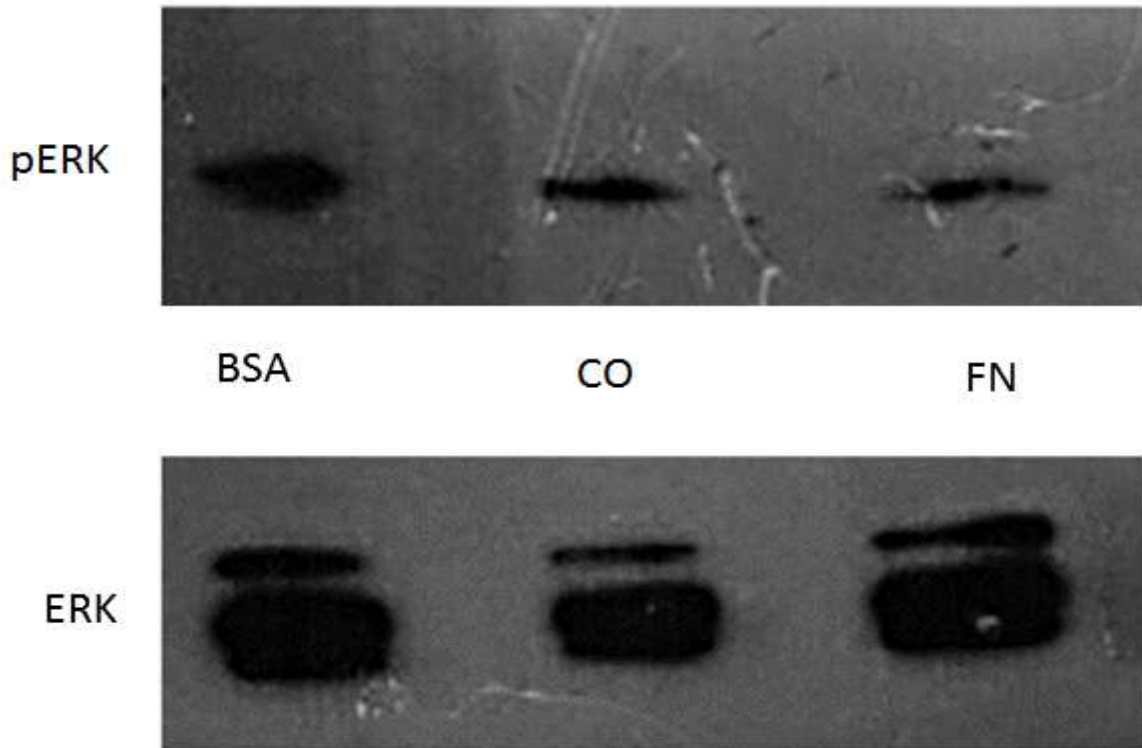


Figura 20. Activación de pERK y ERK. Fibroblastos de encía con agrandamiento gingival inducido por nifedipina se colocaron sobre albúmina (BSA), sobre colágena (CO) o sobre fibronectina (FN) y se dejaron adherirse por 30 min. Posteriormente, los fibroblastos se recuperaron y lisaron para preparar extractos de proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF para ser probadas con anticuerpos anti ERK fosforilada (pERK) o anticuerpos contra ERK total (ERK).

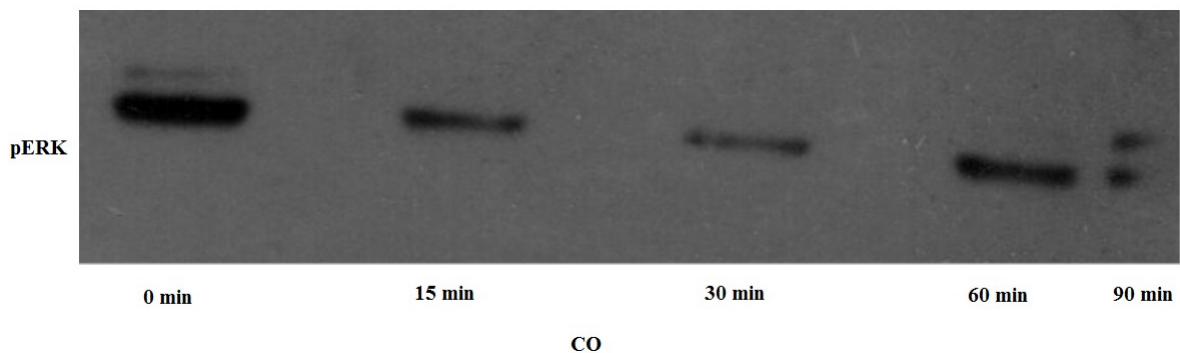


Figura 21. Activación de pERK fibroblastos de encía sana, se colocaron sobre colágena (CO) y se dejaron adherirse en diferentes tiempos 0, 15, 30, 60 y 90 min. Posteriormente, los fibroblastos se recuperaron y lisaron para preparar extractos de proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF para ser probadas con anticuerpos anti ERK fosforilada (pERK).

Finalmente se realizó un ensayo de western blot en fibroblastos Control con el mismo sustrato de colágena, pero a diferentes tiempos. En este experimento se observó que la cinasa pERK se encuentra más activa en el tiempo 0 min comparada con los otros tiempos (Figura 21) esto no hace pensar que la cinasa como tal ya se encuentra activada, a pesar de que los fibroblastos en el tiempo 0 min no se colocaron sobre el sustrato, ya que se dejaron en movimiento para que disminuyera la activación de pERK y así poder compararlas con los otros tiempos, sin embargo la señal sigue siendo muy fuerte al esperado.

7. DISCUSION

Es conocido que, al retirar el tratamiento de nifedipina en los pacientes, el agrandamiento gingival suele detenerse, por eso se considera que la condición de agrandamiento gingival puede ser reversible. Los resultados aquí mostrados dependen de variables como el tiempo de administración del medicamento, los pasos celulares, las condiciones de cultivo, etc. A su vez es importante recordar que el estudio fue realizado *in vitro*.

La expresión de integrinas en la superficie celular, obtenido en esta investigación, indica diferencias cualitativas en la expresión de integrinas en la superficie celular de los fibroblastos gingivales. Las integrinas son una gran familia de receptores transmembrana heterodímeros para moléculas de matriz extracelular, y actúan como los principales mediadores del diálogo molecular entre una célula y su entorno de MEC (Kataoka. 2005) por lo que al haber una disminución de la integrina $\alpha 2$ y un

incremento en la integrina $\alpha 3$ en los fibroblastos NIF esto podría sugerir un cambio en la adhesión y migración del fibroblasto. Existe un informe el cual dice que para iniciar la fagocitosis de la colágena por la interacción adhesiva entre los fibroblastos es necesaria la unión del fibroblasto a la colágena y esta se lleva a cabo por la integrina $\alpha 2$. Esta unión juega un papel crítico en la regulación fagocítica de la internalización del colágeno. (Lee, et al 1996). Una complejidad que presentan la unión de integrinas con los sustratos es que no tienen un único receptor puede unirse a una o varias proteínas de la MEC y, además, un solo ligando puede estar unido por varios heterodímeros de integrina (Takada et. al 2007). Por lo que el incremento de las integrinas $\alpha 3$ podría estar compensando a la integrina $\alpha 2$ cambiando así la forma en la que se adhiere y migran los fibroblastos gingivales. Esto sugiere que el agrandamiento gingival tiene relación con la degradación de la colágena. (Nakasone 1999. Kubota et al. 2009).

Los hallazgos 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, correlacionando lo descrito por la literatura y los resultados obtenidos, sugiero que el agrandamiento gingival no solo está directamente involucrado con la modificación en la expresión de las integrinas $\alpha 2\beta 1$, reportado como el principal receptor de reconocimiento de la colágena en los fibroblastos gingivales (Kataoka 2005) y su degradación sino también se encuentran involucradas otras integrinas como la integrina $\alpha 3$ en la cual se observaron modificaciones en su expresión y es receptor de tipo RGD el cual tiene preferencia en la adhesión a fibronectina. (Hynes

2002). Este hallazgo puede sugerir que la integrina $\alpha 2$ y $\alpha 3$ puede que no sea las únicas alteradas, sino que existan otras integrinas no exploradas en este trabajo que puedan estar influenciando en el comportamiento de los fibroblastos gingivales.

La regulación de la reorganización de la MEC y el papel de los diferentes tipos de células en el ligamento periodontal todavía no se conoce bien a nivel molecular. Los fibroblastos del ligamento periodontal interactúan con la MEC a través de la unión de integrinas de diferentes sustratos colágenos y no colágenos. La interacción de las integrinas con MEC y con los componentes del citoesqueleto intracelularmente se considera que son elementos de transducción de fuerza en los fibroblastos.

Se ha reportado que los fibroblastos que migran sobre superficies recubiertas de fibronectina o colágeno exhiben adherencias pequeñas y de corta duración, a medida que las fuerzas de tracción mueven la célula hacia adelante, se desarman las adherencias focales (adherencias por integrinas) en la parte posterior de la célula, aunque estas son muy estables. (Parsons, J. T., et al. 2010). Los ensayos realizados muestran que los fibroblastos gingivales derivados de pacientes que toman nifedipina se adhieren más a fibronectina y a colágena comparados con los fibroblastos derivados de encía sana (Fig. 13). Esto podría comprobar que los fibroblastos de pacientes que toman nifedipina prolongan más sus adherencias a los sustratos comparados con los fibroblastos de encía sanas. Esto contrasta con los pocos estudios que existen 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).

A favor de los resultados presentados, la alta adherencia de los fibroblastos gingivales derivados de pacientes que toman nifedipina en los sustratos de colágena y fibronectina comparados con los de encía sana podría estar causando que estos no puedan despegarse o deshacer la unión a los sustratos, lo que dificulta al fibroblasto migrar al sitio de interés, llevando más tiempo en migrar y realizar su función de degradar y reciclar las fibras de la MEC y en casos más extremos estos no logren migrar y por tanto lo tanto no degraden las fibras de colágena y fibronectina lo que culminaría en su acumulación y que se presente el agrandamiento gingival.

Con respecto al ensayo de Western blot, ERK cinasa ha estado implicado en la migración de numerosos tipos celulares ya que puede contribuir a alteraciones en el citoesqueleto de actina (Castro B. J 2005) Sin embargo en los experimentos presentados en este trabajo coincide que la ERK cinasa fosforilada ya se encuentra activa y esta activación es independiente de los sustratos a los que se adhieren los fibroblastos por lo que resulta difícil distinguir si es provocado por la unión al sustrato o esta activa por otro mecanismo presente en el fibroblasto, esta activación de la ERK cinasa fosforilada puede deberse a que el fibroblastos la activa al momento que se tripsinizan para despegarlos, los fibroblastos son células que necesitan estar unidas a un sustrato, de lo contrario se activa una vía de muerte celular programada llamada Anoikis (Bonnans C et al 2014), posiblemente se esté activando ERK cinasa fosforilada para mandar estímulos de supervivencia, una vía de señalización fuertemente vinculada también con esta cinasa.

8. CONCLUSIONES

En este estudio, la expresión de integrinas indica diferencias cualitativas en la superficie celular de los fibroblastos gingivales en condiciones normales o tratados con nifedipina. La expresión de las integrinas y sus funciones como la adhesión y migración se ven alteradas en fibroblastos provenientes de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina en contraste con los fibroblastos de encía sana. En los fibroblastos Control se encontró ERK cinasa fosforilada activada independientemente si los fibroblastos se unen a colágena o fibronectina por lo que no se pudo diferenciar su estado de activación en los diferentes sustratos usados.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta investigación señalan como la fibrosis como una explicación probable del agrandamiento gingival inducido por nifedipina, resulta indispensable analizar otras cuestiones que pudieran estar involucradas como la cuantificación de la producción de colágena por parte de los fibroblastos gingivales en cultivo. El análisis de otras células involucradas en cambiar el microambiente del fibroblasto como las células epiteliales de la encía que secretan importantes factores de crecimiento como TGF- β que pudieran influir en el comportamiento de los fibroblastos gingivales.

La detección y cuantificación de otras integrinas que pudieran estar involucradas como la integrina $\alpha 8$, que se ha reportado como abundante en fibroblastos gingivales sanos (Palaiologou, Yukna et al. 2001).

El análisis de Western blot y de ensayos de herida se podrían ampliar al dar un estímulo a las células, en el ensayo de herida podría usarse un quimioatrayente como el MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos) para forzar a las células a migrar y cuantificar la velocidad de migración en diferente sustrato como el de colágena y fibronectina.

10. ANEXO

El procedimiento para obtener los fibroblastos fue el siguiente:

La encía fue donada bajo consentimiento informado, por los pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipina que requerían de una cirugía (gingivectomía) y por individuos sanos. Todos los procedimientos para la obtención de encía fueron realizados por la Mtra. y Esp. en Periodoncia María Guadalupe Rosa Marín González. (Díaz C. y Uribe E. 2014)

10. 1 Gingivectomía

El tratamiento periodontal para estos pacientes fue la realización de una gingivectomía a bisel interno combinado con bisel externo de la cual se tomaron las muestras para los experimentos. (Díaz C. y Uribe E. 2014)

Para realizar la gingivectomía se procedieron con los siguientes pasos:

- Después de anestesiar el área, se realizó un sondeo gingival para marcar puntos sangrantes que sirvan de guía para el procedimiento. Con un mango de bisturí Bard-Parker # 3 y una hoja de bisturí # 15, se realizó la incisión de bisel externo por lo menos tres mm en dirección apical, incluida la creación de nuevas papilas interdetales.
- Se empleó la misma hoja para adelgazar los tejidos gingivales en dirección vestibulolingual en relación con la unión mucogingival.
- Con un bisturí de Orban se realizó la incisión en la base de cada papila, para así conectar la incisión vestibular con la lingual.
- Se eliminaron los tejidos marginales e interdetales con curetas.
- Se realizó un curetaje y una plastia. Al terminar el procedimiento se cubrió el área con apósito quirúrgico.
- Al cabo de una semana se retiran las suturas y el apósito, al paciente se le dan instrucciones para controlar los niveles de placa. Es conveniente el uso de enjuagues de clorhexidina una o dos veces al día por dos o cuatro semanas, el paciente debe llevar una dieta blanda sin irritantes por lo menos tres días.

10.2 Toma de encía de individuos sanos

La encía de individuos sanos fue tomada de la zona del paladar duro con un sacabocados o punch de ocho milímetros. Al obtener las muestras de encía, éstas se mantuvieron en medios específicos para su uso según su uso final (Díaz C. y Uribe E. 2014)

10.3 Generación de cultivos celulares a partir de muestras de encía

Cada muestra de encía fue enjuagada en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con antibiótico y antimicótico un par de veces y la encía fue fragmentada con unas hojas de bisturíes hoja # 22 en porciones de aproximadamente 1 mm³ sobre una caja de petri. En seguida, se tomó el contenido de la caja de petri y se centrifugó a 1500 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante. Se agregaron 5 ml de DMEM suplementado con antibióticos, antimicóticos y colagenasa tipo I. Esta suspensión fue incubada en un baño con agitación constante a una temperatura de 37°C por dos horas. Adicionalmente, cada 15 minutos se agitó la muestra en un agitador mecánico por 30 segundos. Transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y el botón celular obtenido se resuspendió en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, L-glutamina y antibióticos, para posteriormente sembrarlo en una botella de cultivo de 75 cm² (T75, Corning, NY, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuairé™) a 37°C y una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las líneas celulares de fibroblastos se preservaron en crioviales en un tanque de nitrógeno líquido. (Díaz C. y Uribe E. 2014)

11. REFERENCIAS

- Abraham, L. C., Dice, J. F., Lee, K., & Kaplan, D. L. (2007). Phagocytosis and remodeling of collagen matrices. *Exp Cell Res*, 313(5), 1045–1055.
- Acosta, G.A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica*, 25(57), 26-33
- Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., Juliano R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50: 197-263.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, (4), 1-6
- Bartold, P. M., & Narayanan, A. S. (1998). *Biology of the Periodontal Connective Tissues*, Quintessence Publishing Company, Hanover Park, IL *Biological Chemistry* 274(31), 21491-21494.
- Bolzani, G., Della Coletta R., Martelli Junior, H., Graner, E. (2000). Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts *J Periodontal Res*, 35: 51-58.
- Bouvard, D., Pouwels, J., De Franceschi, N., & Ivaska, J. (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (7),430-442
- Brunet, L., Miranda, J., Farre, M., Berini, L.& Mendieta, C. (1996). Gin-gival enlargement induced by drugs. *Drug Saf*, (15):219-231.
- Brunet, L., Miranda, J., Roset, P., Berini, L., Farré, M., & Mendieta, C. (2001). Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with anticonvulsant drugs. *Eur. J. Clin. Invest*, 31(9):781–788

- Carranza, S. (2014). *Clinical Periodontology*, 12th edition, editorial, Elsevier
- Castro, L.A., Elias, L.S., Oton-Leite A.F., De Spíndula-Filho, J.V., Leles, C.R., Batista A.C., et al. (2010). Long-term effects of nifedipine on human gingival epithelium: A histopathological and immunohistochemical study. *J. Oral Sci*, 52(1):55–62.
- Charles, N.S., Chavan, R., Moon, N.J., Nalla, S., Mali, J., & Prajapati, A. (2014). Drug-induced gingival overgrowth: the genetic dimension. *N Am J Med Sci*, 6 (9): 478-480.
- Corrêa, J. D., Queiroz-Junior, C. M., Costa, J. E., Teixeira, A. L., & Silva, T. A. (2011). Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features. *ISRN dentistry*, ID:497850. doi:10.5402/2011/497850
- Bouvard, D., Pouwels De Franceschi, N., & Ivaska, J. (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(7):430-42.
- Díaz R. C., Uribe Q. E. (2014). Caracterización bioquímica e histológica del agrandamiento gingival inducido por nifedipino (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México
- Dill, R.E., & Iacopino, A.M. (1997). Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *J Periodontol*, 68(4):375–380.
- Fratzl, P. (2008). *Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction*. In: Fratzl P. (Editorial) *Collagen*. Springer, Boston, MA
- Gagliano, N., Moscheni, C., Dellavia, C., Stabellini, G., Ferrario, V.F., & Gioia, M. (2005). Immunosuppression and gingival overgrowth: gene and protein expression profiles of collagen turnover in FK506-treated human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol*, 32: 167-173.
- Guo, F., D. E. Carter, A. Mukhopadhyay & 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.

- Horton, E. R., Humphries, J. D., Stutchbury, B., Jacquemet, G., Ballestrem, C., Barry, S. T., et al. (2016). Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of adhesion complex composition. *The J Cell Biol*, 212(3), 349–364.
- Hynes, R.O. (2002). Integrin's: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110: 673–687.
- Hynes, R.O. (2004). The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol*, 23:333-40.
- Ilgenli, T., Atilla, G., & Baylas, H. (1999). Effectiveness of periodontal therapy in patients with drug-induced gingival overgrowth. Long-term results. *J Periodontol*, 70(9), 967–972.
- Beaumont, J., Chesterman, J., Kellett, M., & Durey, K. (2017). Gingival overgrowth: Part 1: Etiology and clinical diagnosis. *The British Dental Journal*, 222 – 285. Nature Publishing Group <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.71>
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., & Roca-Cusachs.P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20 (8), 457-473.
- Juliano, R.L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 283-323.
- Kataoka, M., Shimizu, Y., Kunikiyo, K., Asahara, Y., Azuma, H., Sawa, T., et al. (2001). Nifedipine induces gingival overgrowth in rats through a reduction in collagen phagocytosis by gingival fibroblasts. *J. Periodontol*, 72(8):1078–1083.
- Kataoka, M., Shimizu, Y., Kunikiyo, K., Asahara, Y., Yamashita, K., Ninomiya, M., et al. (2000). Cyclosporine A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J. Cell. Physiol*, 182(3), 351–358.

- Kato, T., Okahashi, N., Kawai, S., Kato, T., Inaba H., Morisaki I., et al. (2005). Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. *J Periodontol*, 76(6), 941-50.
- Kimball, O.P. (1939). The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate. *JAMA*, 112(13), 1244–1245.
- Kleinschmidt, E. G., & Schlaepfer, D. D. (2017). Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Curr Opinion Cell Biol*, 45, 24–30.
- Larjava, H., Koivisto, L., Häkkinen, L., & Heino, J. (2011). Epithelial Integrins with Special Reference to Oral Epithelia. *J Dent Res*, 90(12), 1367–1376.
- Lucas, R.M., Howell, L.P., Wall, B.A. (1985). Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study. *J Periodontol*, 56(4) ,211–215.
- Lucena, S; Arocha P, C., L., Guerrero, Betsy. (2007). Fibronectina: Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. *Rev Inv Clín*, 48(2), 249-262.
- Miranda, J., Brunet, L., Roset, P., Berini, L., Farré, M., & Mendieta, C. (2005). Prevalence and risk of gingival overgrowth in patients treated with diltiazem or verapamil. *J Clin Periodontol*, 32(3), 294–298.
- Mironiuc-Cureu, M., Dumitriu, A., Gheorghiu, I., & Stoian, I. (2014). Gingival overgrowth as secondary effect of calcium channel blockers administration. A case report. *J Med Life*, 7(2), 241–245.
- Mishra, M.B., Khan, Z.Y., Mishra, S. (2011). Gingival overgrowth and drug association: a review. *Indian J Med Sci*, 65: 73-82.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (1), 56-68.
- Mouw, J. K., Ou, G., Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15 (12), 771-785.

- Nagase, H. & Woessner J. F. (1999). Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 274 (31): 21491-21494.
- Nakasone, N., Kubota, T., Hoshino, C., Nohno, K., Itagaki, M., Shimizu, T., et al. (2009). Differential gene and protein expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-3 and TIMP-4 in gingival tissues from drug induced gingival overgrowth. *Arch Oral Boil*, 54(7), 634-641.
- Nanci, A. (2012). Ten Cate's Oral Histology. Lee W., Sodek J., McCulloch C. A., *J. Cell. Physiol*, (168), 695-704.
- Newman, M. T., Carranza, F. (2004). *Periodontología clínica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Nishikawa, S., Nagata, T., Morisaki, I, sl. (1996). Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Periodontol*, 67:463-471.
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci*, 116 (Pt8) 1409–1416.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9), 633–643.
- Pernu, H.E., Pernu, L.M., Huttunen, K.R., Nieminen, P.A., & Knuuttila M.L. (1992). Gingival overgrowth among renal transplant recipients related to immunosuppressive medication and possible local background factors. *J Periodontol*. 63(6), 548–553.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J.W. (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275:21785–21788.
- Ramírez-Rámiz, A., Brunet-Llobet, L., Lahor-Soler, E., Miranda-Rius, J. (2017). On the cellular and molecular mechanisms of drug-Induced gingival overgrowth. *The Open Dentistry Journal*, 11:420-435.

- Rosales, C. (2007). Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Signal Transduction – Receptors, Mediators and Genes*, 7: 386-401.
- Sakamoto, R., Nitta, T., Kamikawa, Y., Kono, S., Kamikawa, Y., Sugihara, K., et al. (2002). Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural studies of gingival fibromatosis: a case report. *Med Electron Microsc*, 35, 248-254.
- Shimada, T., & Takemiya, T. (2014). Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm*. (2014): ID: 901902.
- Shoulders, M., & Raines, R. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78: 929- 958.
- Singh, P., Carraher, C., & Schwarzbauer, J. E. (2010). Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 397–419.
- Somacarrera, M.L., Hernández, G., Acero, J., & Moskow, B.S. (1994). Factors related to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. *J Periodontol*, 65(7):671–675.
- Somacarrera, J., Somacarrera, C., Fernández, L., & Pérez, M. (2013). Agrandamientos gingivales: revisión y puesta al día. *Gaceta dental: Industria y profesiones*, (243), 88-101.
- Sriram, G., Bigliardi, P.L., Bigliardi-Qi, M. (2015). Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Boil*, 94: 483-512.
- Subramani, T., Rathnavelu, V., Alitheen, N.B. (2013). The Possible Potential Therapeutic Targets for Drug Induced Gingival Overgrowth. *Mediators Inflamm*, ID: 639468.
- Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *genome biology*, 8(5), 215.
- Trackman, P.C., Kantarci, A. (2015). Molecular and clinical aspects of drug-induced gingival overgrowth, *J Dent Res*, 94(4), 540–546.
- Uribe, Q. E., Rosales, L. C. (2016). Agrandamiento gingival inducido por medicamentos: bases celulares y moleculares. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XL, 111-124.

- Uzel, M.I., Kantarci, A., Hong, H.H., Uygur, C., Sheff, M.C., Firatli E, et al. (2001). Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. *J Periodontol*, 72(7), 921–931.
- Wentz, L.A., Oliveira, S.C., Moreira, C.H., & Rösing, C.K. (2012). Low prevalence of gingival overgrowth associated to new immunosuppressive protocols with cyclosporin. *Braz. Oral Res*, (26): 64-70.
- Zerón, G.V.J.A., Sautto, T.M. (2016). Agrandamientos gingivales inducidos por medicamentos. Una visión genómica y genética. Revisión de la literatura *Rev Mex Periodontol*, 7 (1), 25-35.