



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA DEL  
AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR NIFEDIPINO

### **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

CAMILA ANDREA DÍAZ RAMÍREZ

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESORES: Mtra. MARÍA GUADALUPE ROSA MARÍN GONZÁLEZ  
Dr. FILIBERTO ENRÍQUEZ HABIB

MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

La tesis titulada “Caracterización bioquímica e histológica del agrandamiento gingival inducido por nifedipino” que presenta la alumna Camila Andrea Díaz Ramírez se realizó bajo la dirección de la Dra. Eileen Uribe Querol y la asesoría de la Mtra. María Guadalupe Rosa Marín González y del Dr. Filiberto Enríquez Habib.

Esta tesis fue financiada con el proyecto IA202013 de la Dra. Eileen Uribe Querol y el proyecto 213711 del Dr. Juan Pedro Laclette correspondiente al Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), de la UNAM y el proyecto 613334 del Dr. Juan Pedro Laclette del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a mi padre David Cervantes Romero por darme siempre su cariño, apoyo y comprensión durante toda mi vida y ayudarme con los recursos necesarios para estudiar e instruirme durante toda mi formación académica.

A mi madre por sus consejos y su tiempo dedicado en ayudarme en cada año de la carrera, a buscar pacientes y prestarse en varias ocasiones a ser mi paciente de práctica. Por siempre estar al pendiente de que estuviera bien y que continuara con mis metas.

A mi hermana por ponerse en mis manos durante los años de licenciatura para que pudiera realizar mis prácticas y por apoyarme con la donación de tejido para la realización de mis experimentos en esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología por todas las enseñanzas académicas y personales que me dejaron en el transcurso de mi vida como estudiante, así como a todos mis profesores de los cuales me llevo sus consejos y experiencias.

A la Mtra. María Guadalupe Rosa Marín González por inducirme en este proyecto de investigación y por realizar las cirugías correspondientes y tomar las biopsias utilizadas en este estudio.

Al Dr. Filiberto Enríquez Habib, por sus comentarios y observaciones que realizó al revisar esta tesis.

A la Dra. Eileen Uribe Querol por su apoyo, tiempo y dedicación durante todo el proceso de la investigación, por instruirme en cada experimento realizado y por ser una inspiración para continuar en el área de la investigación.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por permitirme trabajar en su laboratorio, por realizar observaciones a mi trabajo y darme en muchas ocasiones una visión diferente de mi proyecto de investigación con la finalidad de mejorarlo en cada ocasión.

A la Mtra. Nancy Mora Pérez del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su apoyo técnico y en los seminarios.

A la Mtra. Patricia de la Torre y al Dr. Juan Pedro Laclette del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el apoyo en la realización de la RT-PCR.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad de Microscopía, UNAM; por su instrucción y ayuda brindada en la toma de fotografías con ayuda de microscopio.

Al Dr. Javier Portilla Robertson, Mtro. Daniel Quezada Rivera y Mtro. Edmundo Santos por su colaboración y ayuda en la realización del análisis histológico de las muestras presentadas en esta tesis.

A Teodomiro Pérez Salazar del Laboratorio de Patología Experimental de la Facultad de Odontología, UNAM; por su apoyo en la realización del procesamiento histológico de las biopsias utilizadas en este trabajo.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. RESUMEN</b>   | 9  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b>  | 10 |
| 2.1 ENCÍA   | 10 |
| 2.1.1 <u>Anatomía macroscópica</u>                                  | 10 |
| 2.1.2 <u>Anatomía microscópica</u>                                  | 11 |
| 2.2 ENFERMEDADES GINGIVALES   | 14 |
| 2.3 AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS                    | 18 |
| 2.3.1 <u>Agrandamiento gingival inducido por nifedipino</u>         | 19 |
| <b>3. NIFEDIPINO</b>  | 19 |
| 3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA  | 19 |
| 3.1.1 <u>Síntesis de la piridina</u>                                | 20 |
| 3.2 FISIOLOGÍA  | 21 |
| 3.3 FARMACOLOGÍA  | 22 |
| 3.4 TRATAMIENTO DEL AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO<br>POR FÁRMACOS | 23 |
| <b>4. ANTECEDENTES</b>  | 24 |
| <b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>                                | 26 |
| <b>6. JUSTIFICACIÓN</b>   | 26 |
| <b>7. HIPÓTESIS</b>   | 26 |
| <b>8. OBJETIVOS</b>   | 27 |

|  |    |
|--|----|
| <b>9. MATERIALES Y MÉTODO</b>  | 27 |
| 9.1 DONADORES  | 27 |
| 9.2 ENCÍA  | 28 |
| 9.3 GINGIVECTOMÍA  | 28 |
| 9.4 TOMA DE ENCÍA DE INDIVIDUOS SANOS                                    | 30 |
| 9.5 GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES A PARTIR DE MUESTRAS DE ENCÍA         | 31 |
| 9.6 CULTIVO CELULAR  | 31 |
| 9.7 CURVA DE CRECIMIENTO   | 32 |
| 9.8 MORFOLOGÍA CELULAR   | 32 |
| 9.9 EXTRACCIÓN DE RNA  | 33 |
| 9.10 CUANTIFICACIÓN DE RNA   | 33 |
| 9.11 NANODROP2000c   | 34 |
| 9.12 INTEGRIDAD DEL RNA  | 34 |
| 9.13 RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT – PCR) | 35 |
| 9.13.1 <u>Ciclo del RT-PCR</u>   | 36 |
| 9.13.2 <u>Cebadores para RT-PCR</u>                                      | 36 |
| 9.14 HISTOLOGIA  | 37 |
| 9.14.1 <u>Procesamiento histológico de la encía</u>                      | 37 |
| 9.14.2 <u>Desparafinación</u>  | 38 |
| 9.14.3 <u>Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&amp;E)</u>                 | 38 |
| 9.14.4 <u>Tinción de Masson</u>  | 39 |



|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>10. RESULTADOS</b>       | 40 |
| 10.1 CURVAS DE CRECIMIENTO  | 40 |
| 10.2 CUANTIFICACIÓN DEL RNA | 42 |
| 10.3 CICLO DEL RT-PCR       | 42 |
| 10.4 HISTOLOGÍA             | 44 |
| <b>11. DISCUSIÓN</b>        | 48 |
| <b>12. CONCLUSIONES</b>     | 49 |
| <b>13. BIBLIOGRAFÍA</b>     | 50 |

## 1. RESUMEN

En México, la prevalencia de presión arterial alta, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012), es de 33.3 en hombres y 30.8 en mujeres de cada 100 personas. Este número, va en aumento considerando que es la hipertensión una enfermedad asociada a la obesidad y que en 2013 México, ocupó los primeros lugares de obesidad a nivel mundial. Con base en lo anterior se puede inferir que el número de pacientes tratados con bloqueadores de calcio como el nifedipino va en aumento y con ello el riesgo de presentar agrandamiento gingival inducido por nifedipino. El agrandamiento gingival inducido por nifedipino es una reacción adversa relacionada con el uso sistémico de fármacos, un mecanismo de acción propuesto para el agrandamiento gingival inducido por fármacos es que histológicamente el tejido de un paciente tratado con nifedipino se encuentra con un gran número de células inflamatorias y de colágena densa incluida en el tejido conectivo, así como la elongación y engrosamiento del epitelio. Hasta el momento el mecanismo molecular que promueve el agrandamiento gingival inducido por nifedipino no es claro. Por ello en este trabajo decidimos conocer aspectos histológicos y bioquímicos que subyacen al agrandamiento gingival inducido por este fármaco. En el presente trabajo se realizaron estudios con base en cultivos celulares derivados de pacientes que toman nifedipino comparado con células de un individuo sano, se hicieron comparaciones de la expresión de colágena tipo I, metaloproteasa tipo I (MMP-1) y su inhibidor (TIMP-1) entre una línea de fibroblastos gingivales derivada de un paciente con agrandamiento gingival inducido por nifedipino y una línea de fibroblastos gingivales derivados de un individuo sano, así como el estudio histopatológico. Los resultados de esta investigación demuestran que no existe una proliferación mayor de fibroblastos gingivales humanos de pacientes medicados con nifedipino comparado con la proliferación de fibroblastos gingivales de pacientes sanos, por lo que el agrandamiento no parece ser producto del aumento en la cantidad de células, además existe una gran cantidad de colágena acumulada de acuerdo a los resultados obtenidos en la RT-PCR donde hay una mayor expresión de colágena tipo I y menor expresión de MMP-1.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 ENCÍA

#### 2.1.1 Anatomía macroscópica

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. La encía se divide anatómicamente en tres zonas, encía marginal, interproximal y adherida. La encía marginal, se encuentra en el margen que rodea a los dientes a manera de collar, se encuentra delimitada por el surco gingival y tiene un grosor de 1mm de ancho, por otro lado se encuentra la encía interproximal que forma parte de la encía marginal, se encuentra en el espacio interproximal debajo del área de contacto del diente, su forma suele ser piramidal, aunque esta dependa del punto de contacto entre los dientes contiguos. La encía adherida es la continuación de la encía marginal y se encuentra unida al periostio del hueso alveolar. Su límite se encuentra hasta la línea mucogingival que la divide de la mucosa alveolar. (Figura 1).<sup>1, 2.</sup>

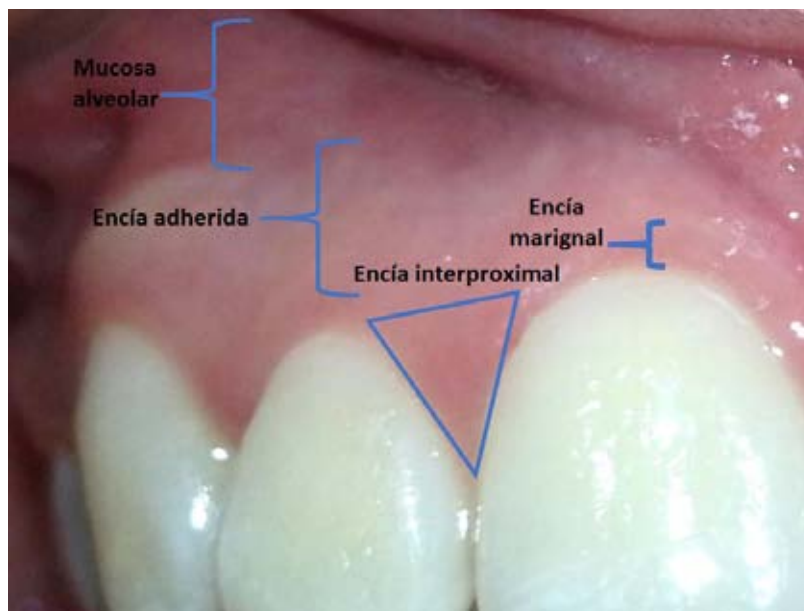


Figura 1. Fotografía de la anatomía macroscópica de la encía.

### 2.1.2 Anatomía microscópica

La encía está compuesta de una capa epitelial y tejido conjuntivo subyacente llamado mesénquima. El epitelio bucal de la encía es de tipo plano estratificado, queratinizado y se encuentra dividido en los siguientes estratos celulares de acuerdo a su grado de diferenciación: basal, espinoso, granuloso y corneo (Figura 2).<sup>1,2,3,4.</sup>

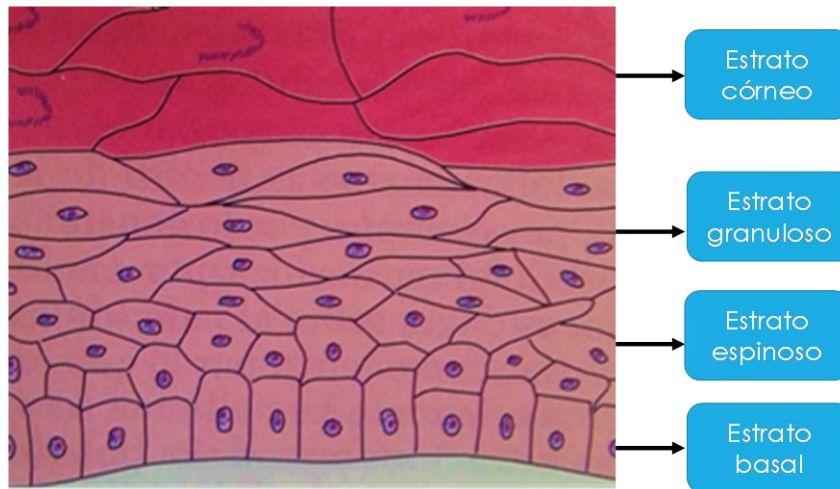


Figura 2. Esquema de los estratos celulares del epitelio plano estratificado. (Modificado de <sup>4</sup>)

Las células del estrato basal se encuentran en contacto con la membrana basal la cual separa el epitelio del mesénquima (Figura 3).<sup>3,4.</sup>

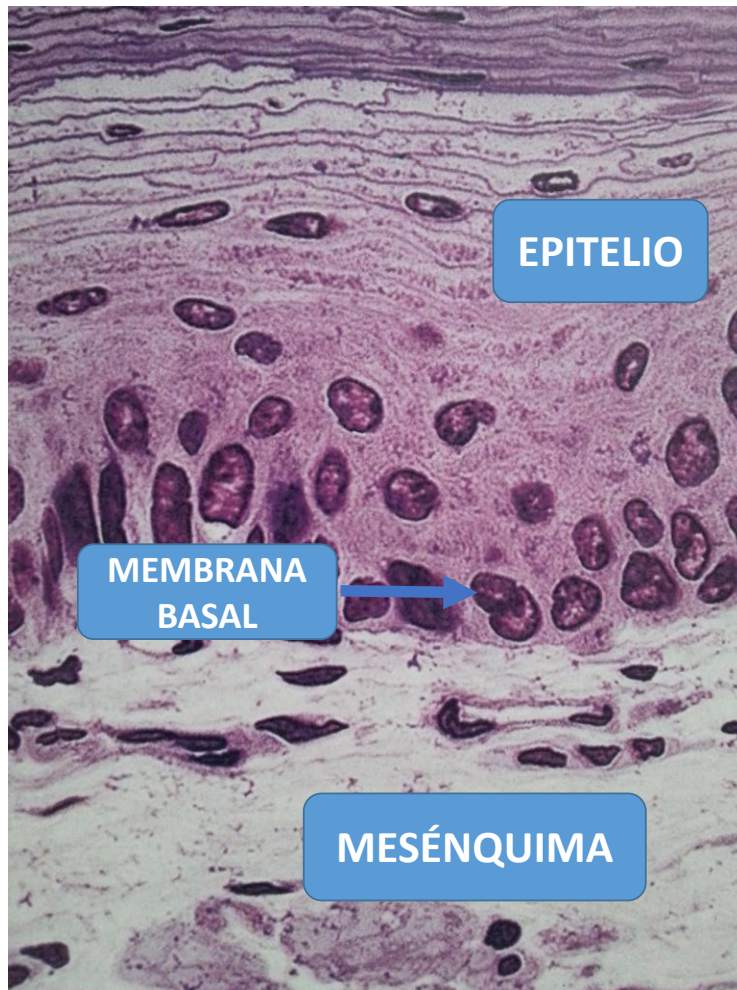


Figura 3: Imagen histológica donde se observa la relación entre el epitelio y el mesénquima.  
(Modificado de <sup>3</sup>)

El mesénquima es el componente predominante de la encía y está compuesto principalmente por fibras de colágena, que compone el 60% del volumen del tejido conjuntivo, vasos y nervios (35%) y células (5%) como el fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos, etc. Las células se encuentran incluidas en una sustancia fundamental amorfa llamada matriz extracelular.<sup>1,2,3,4.</sup>

El fibroblasto es la célula predominante en el tejido conjuntivo, conforma cerca del 65% de la población celular. Es de forma ahusada o estrellada con núcleo ovalado que contiene uno o más nucléolos, es una de las células responsables del mantenimiento y de la reparación de los tejidos gingivales.

Además, se ocupa de la producción de las fibras de colágena e interviene en la síntesis de la matriz extracelular (Figura 4).<sup>3,4.</sup>

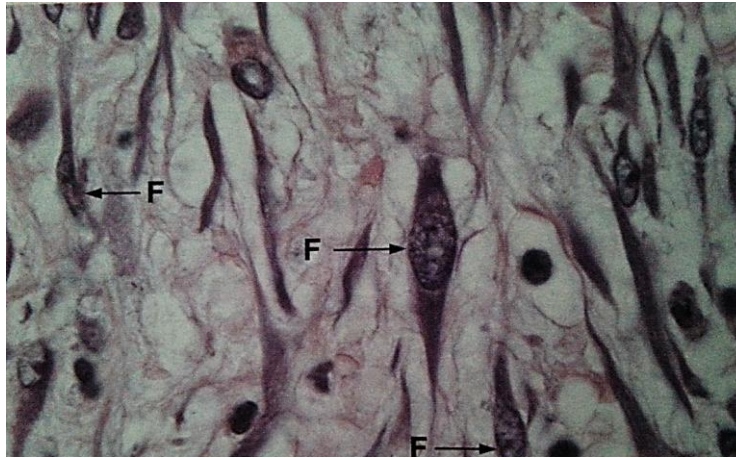


Figura 4. Imagen histológica donde se observa la morfología del fibroblasto. (Tomado de<sup>3</sup>)

La matriz extracelular es esencial para el desarrollo normal sus funciones tisulares tales como transporte de agua, electrolitos y nutrientes. Sus componentes principales lo constituyen los proteoglicanos y glucoproteínas, y a su vez también contiene una familia de proteasas denominadas metaloproteasas.<sup>1,2, 5.</sup>

Las metaloproteasas (MMPs) pertenecen a una familia de endopeptidasas zinc-dependientes que intervienen en los procesos fisiológicos de organogénesis, cicatrización, involución uterina y también en diversas condiciones patológicas, como la inflamación, enfermedades autoinmunes, carcinogénesis y son capaces de degradar las proteínas que se encuentran en la matriz extracelular.<sup>5.</sup>

Las MMPs se clasifican de acuerdo a sus diferencias estructurales en cinco grupos. Uno de ellos son las colagenasas, que son capaces de dividir la colágena intersticial I, II y III dando lugar a colágeno desnaturalizado. La metaloproteasa tipo I pertenece a este grupo de colagenasas (MMP-1) y degrada colágeno tipo I.<sup>5,6.</sup>

Por otro lado, los inhibidores específicos de MMPs son los inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs). Los TIMPs se unen a las MMPs de manera no covalente en complejos estequiométricos (1:1), formando un complejo reversible y de alta afinidad con dichas proenzimas. Esto impide que las MMPs puedan funcionar. En el humano se conocen 4 tipos de TIMPs. El tipo 1 y 4 son los que inhiben a la MMP-1.<sup>5</sup>

## 2.2 ENFERMEDADES GINGIVALES

Las enfermedades gingivales son una amplia familia de patologías diferentes y complejas, que se encuentran confinadas a la encía y son el resultado de diferentes etiologías. La característica común a todas las enfermedades gingivales es que se localizan exclusivamente sobre la encía y no afectan al resto del periodonto.<sup>7</sup>

En el Simposio Internacional de la Academia Americana de Periodontología (AAP), realizado en 1999, se revisó la clasificación de las enfermedades periodontales. En la nueva clasificación resultante se acordó incluir una categoría que hiciera alusión a los problemas localizados a nivel gingival, por lo cual la clasificación más aceptada fue la que Gary C. Armitage dio a conocer en ese mismo año. Armitage clasificó a las enfermedades gingivales en enfermedades gingivales inducidas por placa y enfermedades gingivales no inducidas por placa.<sup>7,8</sup>

Clasificación de las enfermedades gingivales.<sup>8</sup>

- A. Enfermedades dentales inducidas por placa
  - I. Gingivitis asociada a la placa dental
    - a. sin factores contribuyentes locales
    - b. con factores contribuyentes locales
  - 2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos
    - A. Asociado con el sistema endócrino

1) gingivitis asociadas con la pubertad

2) gingivitis asociada al ciclo menstrual

3) asociada al embarazo

a) gingivitis

b) granuloma piógeno

4) diabetes mellitus asociada a la gingivitis

B. Asociada con discrasias sanguíneas

1) gingivitis asociada a leucemia

2) otros

3. Enfermedades gingivales modificadas por fármacos

A. Enfermedades gingivales inducidas por fármacos

1) agrandamiento gingival por influencia de fármacos

2) gingivitis con influencia de fármacos

a) Gingivitis asociada a anticonceptivos orales

b) Otros

4. Enfermedades gingivales modificadas por desnutrición

A. Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico

B. Otros

B. Lesiones gingivales no inducidas por placa

1. Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico

A. Lesiones asociadas a gonorrea



- B. Lesiones asociadas a *Treponema pallidum*
  - C. Lesiones asociadas a especies de estreptococos
  - d. Otros
2. Enfermedades gingivales de origen viral
- A. Infecciones por virus del herpes
    - 1) Gingivoestomatitis herpética primaria
    - 2) Herpes oral recurrente
    - 3) Infecciones por la varicela Zoster
  - B. Otros
3. Enfermedades gingivales de origen fúngico
- A. Infecciones por Cándida
    - 1) candidiasis gingival generalizada
  - b. Eritema gingival lineal
  - c. Histoplasmosis
  - d. Otro
4. Lesiones gingivales de origen genético
- A. Fibromatosis gingival hereditaria
  - B. Otro
5. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas
- A. Trastornos mucocutáneos
    - 1) liquen plano

- 2) penfigoide
- 3) pénfigo vulgar
- 4) eritema multiforme
- 5) lupus eritematoso
- 6) otros

#### B. Reacciones alérgicas

##### 1) materiales de restauración dental

- a) mercurio
- b) níquel
- c) acrílico
- d) otros

##### 2) reacciones atribuibles a:

- a) pastas de dientes
- b) enjuagues bucales
- c) aditivos de goma de mascar
- d) alimentos

##### 3) otros

#### 6. Lesiones traumáticas (ficticia, iatrogénicas, accidental)

A. Lesión química

B. Lesión física

C. Lesión térmica

7. Reacciones de cuerpo extraño

8. No especificado (NOS)

### 2.3 AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS

El agrandamiento gingival inducido por fármacos es una reacción adversa relacionada con el uso sistémico de fármacos como son fenitoína, ciclosporina y antagonistas del calcio, especialmente nifedipino. Estos medicamentos son estructuralmente distintos, pero tienen en común la acción de inhibir la captación celular de calcio, este mecanismo se considera implicado en la patogenia del agrandamiento gingival. A su vez también se le considera como una alteración histomorfológica debido a efectos secundarios de un medicamento en la matriz extracelular. Varios fármacos inducen el agrandamiento gingival, pero fenitoína, ciclosporina, y el nifedipino producen alteraciones significativas en términos de prevalencia y gravedad del agrandamiento gingival.<sup>9,10,11.</sup>

Por otro lado, cabe mencionar que la etiología del agrandamiento gingival es multifactorial y se describen diversas variables como son.<sup>10,12,13.</sup>

- Demográficas: edad y sexo
- Farmacológicas: dosis, tiempo, uso, concentración del medicamento en la saliva
- Periodontal: cantidad de placa dental e inflamación gingival.
- Genética: predisposición hereditaria de los fibroblastos ante la presencia del medicamento

El agrandamiento gingival inducido por fármacos se describió por primera vez en 1939 en un paciente epiléptico que recibía tratamiento con difenilhidantoína, posteriormente desde el año de 1980 y hasta nuestros días se describieron algunos casos asociados a la utilización de ciclosporina y nifedipino.<sup>11,14.</sup>

### 2.3.1 Agrandamiento gingival inducido por nifedipino

El primer reporte de agrandamiento gingival causado por nifedipino fue en 1984 por Lederman y Roman. Además, se ha visto este tipo de agrandamiento también en pacientes que toman otros derivados de dihidropiridinas como nicardipina, felodipino, amoldipina y diltiazem. <sup>12</sup>.

Entre los antagonistas del calcio, el nifedipino es la droga más comúnmente relacionada con agrandamiento gingival, cuya prevalencia oscila entre el 20% y 83 %. <sup>10,13</sup>.

## 3. NIFEDIPINO

### 3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

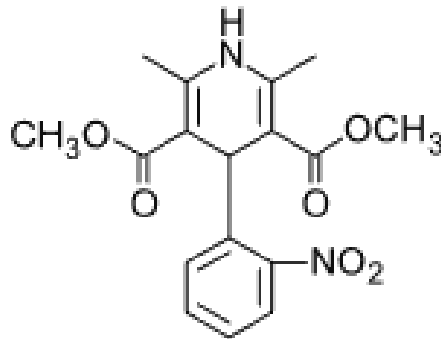


FIGURA 5. Estructura química del nifedipino (Tomado de <sup>15</sup>)

El nifedipino pertenece al grupo de las dihidropiridinas. Actúa predominantemente sobre la circulación periférica relajando la musculatura lisa vascular y produciendo vasodilatación. Se utiliza para el tratamiento de la hipertensión y la profilaxis de la angina de pecho. <sup>12,13</sup>.

### 3.1.1 Síntesis de la piridina

La piridina es un líquido incoloro de olor desagradable, presenta en su estructura un heterociclo de seis eslabones, y tiene un carácter aromático. Es muy soluble en agua. Normalmente se lo extrae del alquitrán de hulla conjuntamente a las metilpiridinas, denominadas picolinas.

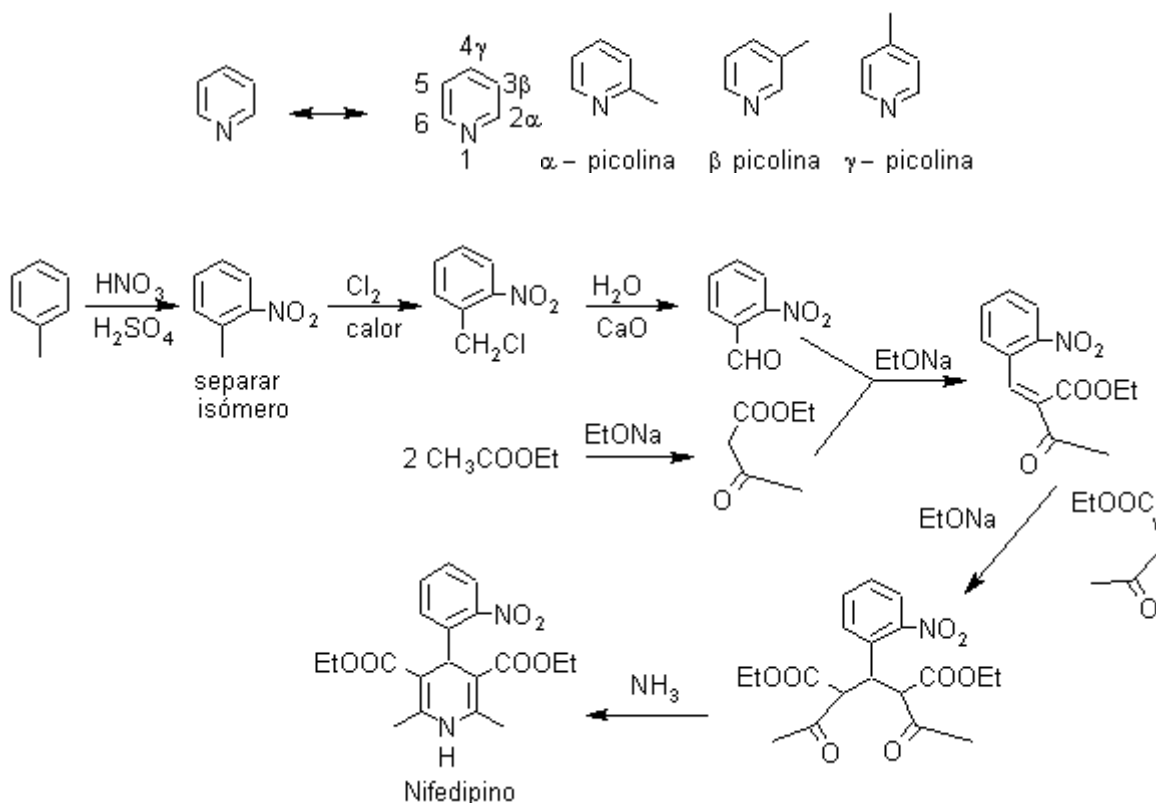


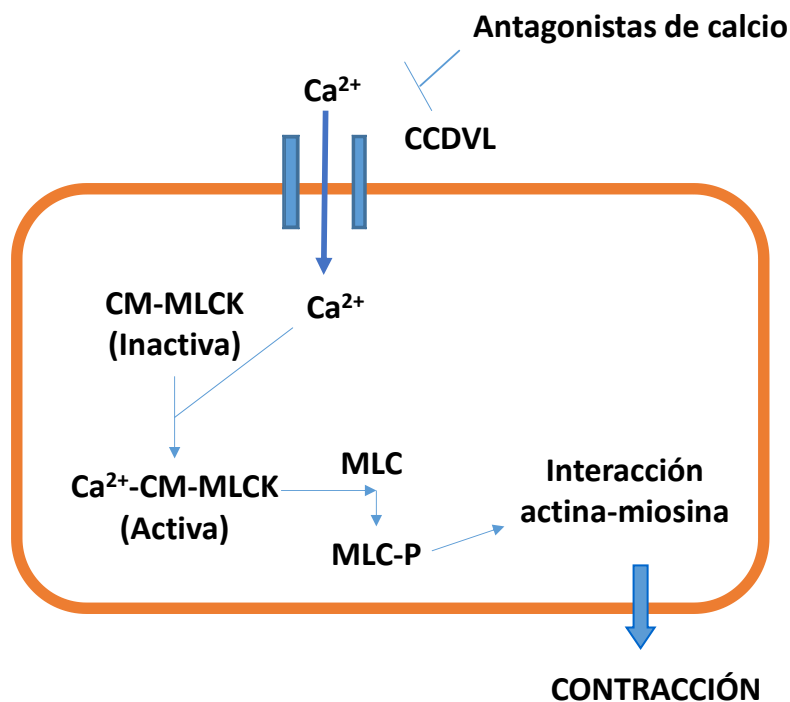
FIGURA 6. Síntesis del nifedipino (Tomado de <sup>15</sup>)

El material de partida es el tolueno, que luego de nitrarse y separar el isómero orto-nitrotolueno, permite halogenar el grupo metilo y luego transformarlo en aldehído, para hacerlo reaccionar con el cetoéster. Al compuesto  $\alpha,\beta$ -insaturado CO formado se adiciona el enolato del cetoéster, para formar el 1,5-diCO que se cicla con el amoníaco (Figura 5).<sup>15</sup>

### 3.2 FISIOLÓGÍA

Los fármacos denominados "antagonistas del calcio" reducen la entrada de calcio en las células del miocardio y vasos sanguíneos como consecuencia del bloqueo de los canales de calcio dependientes del voltaje. <sup>10</sup>.

El nifedipino actúa predominantemente sobre la circulación periférica relajando la musculatura lisa vascular y produciendo vasodilatación y por lo tanto se usa en el tratamiento de la hipertensión arterial y la profilaxis de la angina de pecho. <sup>12,13</sup>.



Relajación del músculo liso vascular  
FIGURA 7. Acción de los antagonistas de calcio sobre el músculo liso vascular. Al entrar el calcio a la célula muscular es captado por la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) la cual al activarse transforma la miosina ligera (MLC) en miosina fosfatada de cadena ligera (MLCP), lo que da una interacción entre actina y miosina dando lugar a la contracción. Al entrar en juego los fármacos bloqueadores de calcio dependientes de voltaje (CCDVL) el calcio intracelular baja y el resultado final es la vasodilatación del músculo liso vascular.

Como todos los antagonistas del calcio, el nifedipino impide la entrada de calcio en las células de los músculos lisos vasculares, bloqueando el poro del canal de calcio. Mientras que el verapamil y el diltiazem afectan a los canales de calcio presentes en los nodos senoatriales y atrioventriculares y también los presentes en la vasculatura lisa, el nifedipino actúa solamente sobre estos últimos ocasionando un potente efecto vasodilatador (Figura 7).<sup>10,13.</sup>

El descenso del calcio intracelular inhibe el mecanismo contráctil de las células vasculares con la consiguiente vasodilatación, tanto de las arterias coronarias como de los vasos periféricos.<sup>10,16.</sup>

La vasodilatación coronaria con el correspondiente aumento del flujo sanguíneo, incrementa la llegada de oxígeno a los tejidos del miocardio, al mismo tiempo que la vasodilatación periférica reduce las resistencias periféricas, la presión arterial sistémica y la postcarga. La reducción de la postcarga, a su vez, reduce la presión de las paredes del miocardio y, en consecuencia, su demanda de oxígeno (Figura 7).<sup>10.</sup>

### 3.3 FARMACOLOGÍA

El nifedipino es de acción rápida, es casi completamente absorbido después de su administración oral (90%), aunque por experimentar un metabolismo hepático de primer paso, su biodisponibilidad se reduce al 50-70%. Es decir, el fármaco al ser absorbido por el sistema digestivo entra al sistema porta hepático, donde una vez en el hígado, el fármaco es metabolizado por este órgano, lo cual reduce su biodisponibilidad en el sistema circulatorio. Existen varias formas de absorción del fármaco la estándar y la retardada. La forma retardada del nifedipino muestra una biodisponibilidad del 86% en relación a la forma estándar cuando se administran de forma crónica. La farmacocinética del nifedipino no es afectada por los alimentos, pero la biodisponibilidad aumenta en presencia de una insuficiencia hepática.<sup>16.</sup>

De igual forma, los ancianos muestran una mayor biodisponibilidad al nifedipino, mientras que la reducción del tránsito intestinal puede afectar su absorción de forma impredecible.

Aunque el nifedipino puede administrarse sublingualmente en una formulación líquida adecuada, parece ser que su absorción por esta vía es pequeña y, al absorberse sistémicamente la fracción ingerida, el resultado final es parecido al del nifedipino estándar. Después de la administración oral de la formulación estándar de nifedipino los efectos hipotensores comienzan a manifestarse entre los 30 minutos y una hora, alcanzándose el máximo a los 30 minutos a dos horas. La duración del efecto farmacodinámico es de unas ocho horas. En el caso de las formulaciones retardadas, las concentraciones máximas se alcanzan a las seis a ocho horas, con el correspondiente retraso de los efectos hipotensores.<sup>16</sup>

El nifedipino se distribuye muy bien por todo el cuerpo, incluyendo la leche materna. Se une en un 92-98% a las proteínas del plasma, aunque esta unión es mucho menor en los pacientes con disfunción hepática o renal.

El metabolismo hepático del nifedipino es rápido y completo, produciéndose dos metabolitos inactivos que son excretados, junto con el fármaco nativo, en la orina y, en menor extensión en las heces. Sólo un 5% del nifedipino sin alterar es recuperado en la orina. La semi-vida de eliminación es de dos a cinco horas, aumentando hasta las siete horas en los pacientes con una insuficiencia hepática clínicamente significativa.<sup>16</sup>

### 3.4 TRATAMIENTO DEL AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR FÁRMACOS

Antes de realizar cualquier tipo de tratamiento es indispensable basarlo en un diagnóstico preciso, realizar la reducción o eliminación de los agentes causales, llevar un control del riesgo y finalmente hacer la corrección de los efectos dañinos de la enfermedad.<sup>1,2,17.</sup>



Por lo cual el tratamiento para el agrandamiento gingival inducido por fármacos se divide en cuatro fases: sistémica, higiénica, correctora y de mantenimiento.<sup>17</sup>.

La fase sistémica hace referencia a realizar la interconsulta con el médico tratante de la enfermedad sistémica del paciente y sugerir el cambio del medicamento que causa el agrandamiento gingival, siempre y cuando sea posible y no ponga en riesgo la salud sistémica del paciente.

La fase higiénica tiene como objetivo eliminar las causas locales del agrandamiento gingival, incluyendo placa y cálculo, restauraciones defectuosas y otros factores que aparezcan asociados a la inflamación o incomodidad del paciente; esta fase incluye la educación del paciente y la instrucción para la higiene oral.<sup>2,17</sup>.

En la fase correctora se incluyen procedimientos diseñados para corregir los efectos del agrandamiento gingival sobre los tejidos gingivales, en estos casos se lleva a cabo una gingivectomía de la zona que presenta agrandamiento gingival.<sup>2,17</sup>.

La fase de mantenimiento es parte esencial de cualquier plan de tratamiento, en esta se llevan a cabo los refuerzos de higiene para que el paciente mantenga bajos niveles de placa y así disminuir el agrandamiento gingival que seguirá existiendo si no fue posible tomar otra alternativa al fármaco inductor del agrandamiento gingival. <sup>2,17</sup>.

#### **4. ANTECEDENTES**

La respuesta de hipersensibilidad al uso de nifedipino está directamente relacionada con los fibroblastos gingivales, ya que la cantidad de nifedipino concentrado en el líquido crevicular es más alto que con otros medicamentos que se encuentran relacionados con el agrandamiento gingival.

Dichos fibroblastos incrementan la producción de colágena y matriz extracelular configurados de forma densa. Esta respuesta se ve exacerbada en presencia de placa dentobacteriana.<sup>8,18.</sup>

Por otro lado, un mecanismo de acción propuesto para el agrandamiento gingival inducido por fármacos es que histológicamente el tejido de un paciente tratado con nifedipino se encontraba con un gran número de células inflamatorias y de colágena densa incluida en el tejido conectivo, así como la elongación y engrosamiento del epitelio.<sup>18,19.</sup>

Hasta el momento el mecanismo molecular que promueve el agrandamiento gingival inducido por nifedipino no es claro. Por ello en este trabajo decidimos conocer aspectos histológicos y bioquímicos que subyacen al agrandamiento gingival inducido por este fármaco.

En el presente trabajo se realizaron estudios con base en cultivos celulares derivados de pacientes que toman nifedipino comparado con células de un individuo sano, se hicieron comparaciones de la expresión de colágena tipo I, metaloproteasa tipo I (MMP-1) y su inhibidor (TIMP-1) entre una línea de fibroblastos gingivales derivada de un paciente con agrandamiento gingival inducido por nifedipino y una línea de fibroblastos gingivales derivados de un individuo sano, así como el estudio histopatológico.

## **5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En México, la prevalencia de presión arterial alta, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012) (tomando en cuenta los criterios establecidos para la población de 20 años y más), es de 33.3 en hombres y 30.8 en mujeres de cada 100 personas. Este número, va en aumento considerando que es la hipertensión una enfermedad asociada a la obesidad y que en 2013 México, ocupó los primeros lugares de obesidad a nivel mundial. Con base en lo anterior se puede inferir que el número de pacientes tratados con bloqueadores de calcio como el nifedipino va en aumento y con ello el riesgo de presentar agrandamiento gingival inducido por nifedipino.<sup>20</sup>

## **6. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que no existen estudios detallados sobre el crecimiento celular del agrandamiento gingival inducido por nifedipino, ni estudios histológicos que demuestren cual es la causa del agrandamiento, el único tratamiento posible es realizar una gingivectomia cada determinado tiempo al paciente. Con el presente trabajo se puede comprender de mejor manera el comportamiento del agrandamiento gingival inducido por nifedipino y así en un futuro buscar alternativas de tratamiento.

## **7. HIPÓTESIS**

- El nifedipino promueve una proliferación de los fibroblastos gingivales. El nifedipino promueve la sobreexpresión y sobreproducción de colágena tipo I por parte de fibroblastos gingivales humanos.
- El nifedipino inhibe la expresión de la metaloproteasa tipo I (MMP-1) por parte de fibroblastos gingivales humanos.
- El nifedipino promueve la expresión del inhibidor de metaloproteasa tipo I (TIMP-1) por parte de fibroblastos gingivales humanos.

## **8. OBJETIVOS**

### **- OBJETIVO GENERAL**

Describir histopatológica y bioquímicamente el agrandamiento gingival causado por nifedipino.

### **- OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar la proliferación de fibroblastos gingivales derivados de biopsias de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipino, mediante curvas de crecimiento. Determinar la expresión de colágena tipo I, metaloproteasa tipo I e inhibidor de metaloproteasa tipo I, mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
- Evaluar la cantidad de colágena inmadura y madura en cortes histológicos derivados de biopsias de pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipino, mediante las técnicas de hematoxilina y eosina y tricrómica de Masson.

## **9. MATERIALES Y MÉTODO**

### **9.1 DONADORES**

- Pacientes que presentaban agrandamiento gingival inducido por nifedipino toman nifedipino al menos desde hace 4 años y son hipertensos controlados.
- Individuos sanos que no presentaban agrandamiento gingival ni algún otro padecimiento periodontal.

## 9.2 ENCÍA

La encía fue donada bajo consentimiento informado, por los pacientes con agrandamiento gingival inducido por nifedipino 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.

## 9.3 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.

La gingivectomía tiene como ventaja que se trata de una técnica rápida pero como desventaja para el paciente es una mayor molestia posoperatoria y una mayor probabilidad de hemorragia posoperatoria.<sup>2</sup>

Para realizar la gingivectomía se procedieron con los siguientes pasos:<sup>2</sup>

- 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 3mm 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 3 días.<sup>2</sup>

A continuación se muestran las fotografías de la toma de la biopsia y de la gingivectomía de los pacientes que presentaban agrandamiento gingival inducido por nifedipino.

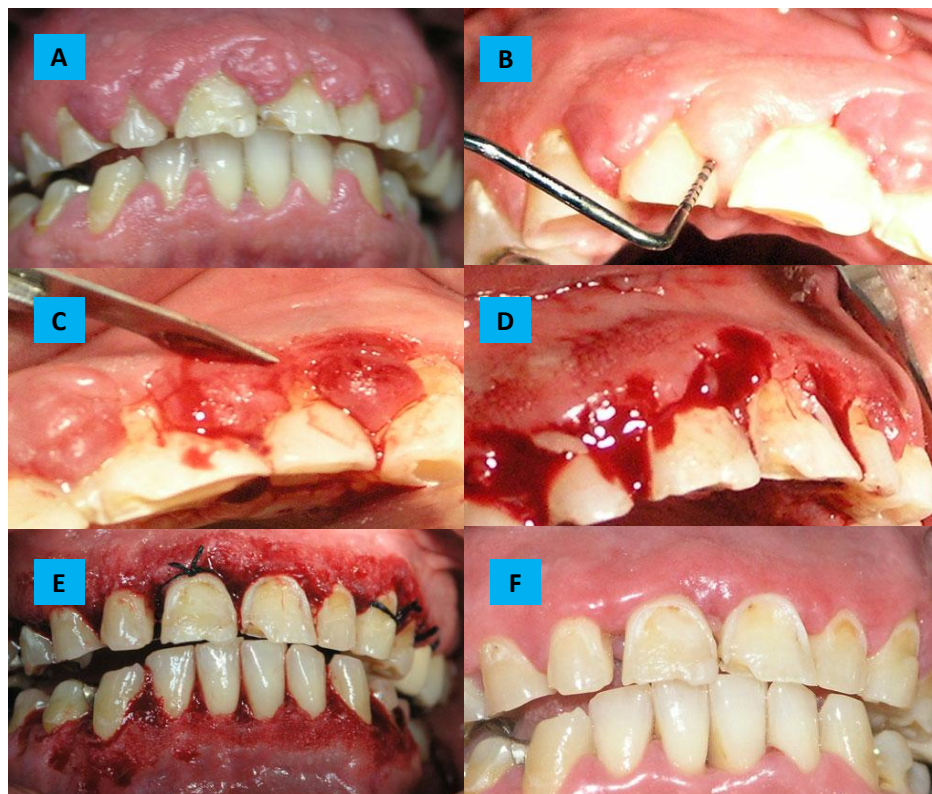


Figura 8: Fotografías tomadas durante la toma de la biopsia y la gingivectomía de un paciente que presentaba agrandamiento gingival inducido por nifedipino. A. se observa el AG inducido por nifedipino, B. se realiza el sondeo con ayuda de una sonda periodontal, C. se realiza la incisión a bisel interno, D. se retiraron las papilas que se encontraban con AG, E. se observa el resultado al concluir la cirugía, F. se aprecia la encía una vez que cicatrizó después de la cirugía.

#### 9.4 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.

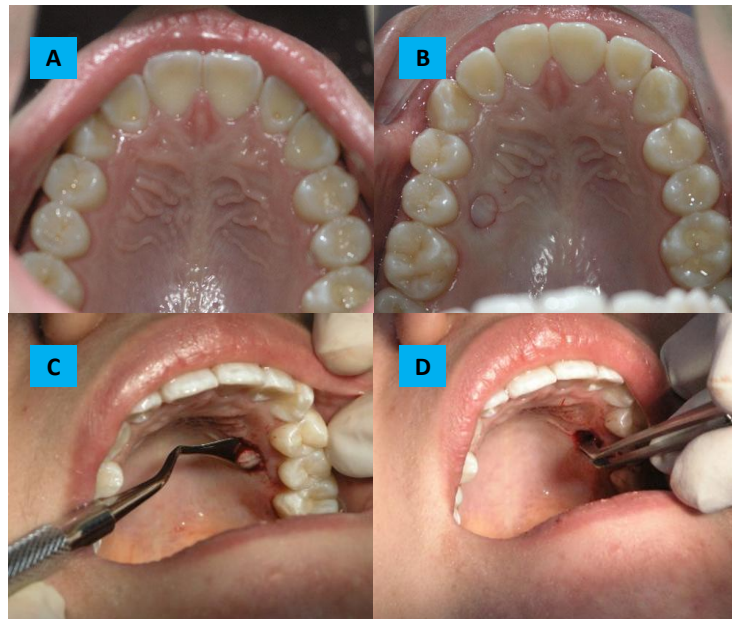


Figura 9: Fotografías tomadas durante la obtención de la biopsia del paciente sano. A. se observa la zona del paladar duro de donde se obtendrá la biopsia, B. con ayuda del punch se delimitó la zona de la biopsia, C. con ayuda de un bisturí de Kirkland se separó el tejido, D. con unas pinzas se tomó la muestra.

## 9.5 GENERACIÓN DE LÍNEAS 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  $1 \text{ mm}^3$  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  $37^\circ\text{C}$  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  $75 \text{ cm}^2$  (T75, Corning, NY, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuair<sup>TM</sup>) a  $37^\circ\text{C}$  y una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las líneas celulares de fibroblastos se preservaron en crioviales en un tanque de nitrógeno líquido.

## 9.6 CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares se mantuvieron en cajas de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$  y fueron nutridas con medio de cultivo celular DMEM (GIBCO, invitrogen) que fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), 8 mM de L-glutamina (GIBCO), penicilina/estreptomicina/anfotericina B (50,000 unidades/mL, 50,000  $\mu\text{g/mL}$  y, 25  $\mu\text{g/mL}$ , GIBCO) evitando así cualquier tipo de contaminación. Las líneas celulares se mantuvieron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  y con una atmósfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células estuvieron en constante revisión.



## 9.7 CURVA DE CRECIMIENTO

De un cultivo en confluencia, se prepararon 10 ml de una suspensión celular con  $3 \times 10^5$  cel, posteriormente se colocaron en media placa con 96 pozos, 100  $\mu$ l por pozo de la suspensión de células ( $3 \times 10^3$  cel. /pozo) por línea celular dejando la columna 1 vacía (blanco). En seguida se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, cada 24 h se fijaron las células de 4 pozos por 15 min con 50  $\mu$ l de glutaraldehído al 1 % en PBS a temperatura ambiente, al finalizar ese tiempo se eliminó el glutaraldehído y se mantuvieron los pozos hidratados con 100  $\mu$ l de agua desionizada estéril. El medio de cultivo se renovó cada tres días a los pozos correspondientes.

Al finalizar los días de cultivo, que fueron de 24 días por curva, se lavaron los pozos 2 veces más con agua desionizada, con recambios rápidos, inmediatamente se tiñó la placa por 30 min a temperatura ambiente con 50  $\mu$ l por pozo de cristal violeta al 0.5 % (en 20 % de metanol en PBS). Mientras transcurrían los 30 min se tomaron fotografías al azar de tres pozos por día (ver más adelante). Después se lavaron los pozos con agua desionizada 6 veces (3 veces con 100  $\mu$ l y 3 más con 200  $\mu$ l) con agitación manual cada vez. Posteriormente se incubó la placa 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l/pozo de SDS al 1 % en agua. Por último se leyó el nivel de absorbancia en un lector de placas a 590 nm.

## 9.8 MORFOLOGÍA CELULAR

Una vez que se tiñó la placa con cristal violeta, se tomaron las fotografías del cultivo con ayuda de un microscopio. Estas fotografías se tomaron al azar eligiendo 3 pozos por cada uno de los 24 días que duró la curva de crecimiento.

## 9.9 EXTRACCIÓN DE RNA

Esta técnica fue realizada con guantes. Para la obtención del RNA se utilizaron cultivos confluentes de fibroblastos en cajas de 6 pozos. Se realizaron tres enjuagues con PBS con agitación ligera. Se utilizó 1 ml de trizol para despegar las células de 3 pozos y esta suspensión fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Posteriormente, al tubo de 1.5 ml se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 5 min. para obtener la fase acuosa que se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo, se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol y se agitó por 10 segundos en un agitador mecánico para después dejarlo reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

Pasado este tiempo, se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 5 min a 4°C donde y se obtuvo el botón de RNA. El sobrenadante fue retirado, se colocó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm, a 4°C por 5 min. Se decantó el etanol y se secó a temperatura ambiente. El botón de RNA se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para ser incubado en termoblock a 55°C por 5 min. El RNA fue congelado a -80°C hasta su uso.

## 9.10 CUANTIFICACIÓN DE RNA

La manipulación de las muestras de RNA fue realizada con guantes. Las muestras se descongelaron a 4°C para la preservación y cuantificación del RNA en Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Se realizó la calibración en el Nanodrop con 2  $\mu$ l de solución calibradora hasta obtener una densidad óptica igual a cero. Una vez realizado esto, se colocó 1.5  $\mu$ l del RNA de cada muestra para obtener la concentración y grado de pureza del RNA. Las alícuotas de RNA se preservaron nuevamente a -70°C.

### 9.11 NANODROP 2000c

El Nanodrop (Thermo Scientific) es el único espectrofotómetro de micro-volumen que integra una tecnología patentada para el análisis de muestras pequeña de 0,5  $\mu$ l hasta 2  $\mu$ l. Se encuentran pre-configurados para determinar la concentración de DNA, RNA (A260), proteínas (A280) y pureza de la muestra (260/280). El software es de fácil uso e incluye métodos personalizados y de exploración de datos, además de que la calibración del Nanodrop 2000c se realizó utilizando un fluido control.

### 9.12 INTEGRIDAD DEL RNA

Para conocer la integridad del RNA, se utilizaron geles de agarosa al 1% con los que se realizó la electroforesis y posteriormente la tinción con bromuro de etidio.

### 9.13 RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT – PCR)

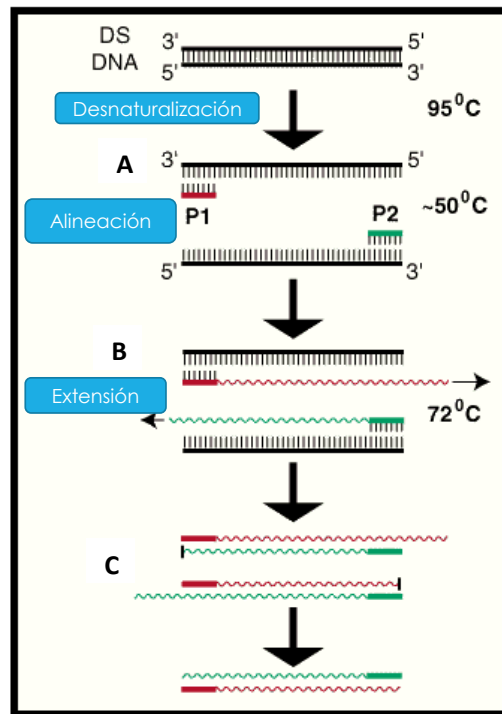


FIGURA 10. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa. A. Se aumenta la temperatura para separar las cadenas de DNA o RNA. B. Se colocan los primers y se alinean en su posición iniciando por 3' del molde. C. A partir de la porción copiada se realiza una extensión de la cadena.

La retrotranscripción (RT, por sus siglas en inglés) o transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) son dos procedimientos que nos sirven para estudiar ácidos nucleicos. La RT consiste en transcribir una cadena de RNA a DNA complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa reversa y la PCR consiste en amplificar una secuencia de DNA cientos de veces. Estos procedimientos se pueden acoplar en una sola reacción por lo que se denomina RT-PCR. Este formato de un sólo paso reduce la variabilidad de reacción para mejorar la reproducibilidad de la RT y proporciona un mayor rendimiento del cDNA.<sup>18</sup>.

La PCR consiste en un par de cebadores de oligonucleótidos sintéticos o primers que flanquean la secuencia de cDNA del gen que se quiere amplificar. Así, mediante una serie repetitiva de ciclos que implican: la desnaturalización del molde, la hibridación de los cebadores y la extensión de los cebadores hibridados se obtienen muchas copias idénticas al molde de cDNA (Figura 10).<sup>21</sup>.

### 9.13.1 Ciclo del RT-PCR

Se utilizaron 25 ng de RNA para cada reacción de RT-PCR y se siguió el procedimiento indicado por el fabricante (Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq). Se utilizaron cebadores para colágena tipo I (COL-1), metaloproteasa tipo I (MMP-1), inhibidor de metaloproteasa tipo I (TIMP-1) y gliceraldehido-3-.fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

### 9.13.2 Cebadores para RT-PCR

| Primer Forward                                     | Primer Reverse                                   | Longitud Del Primer | Producto final (bp) | Temperatura de alineamiento |
|--|--|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| COL-1<br>5'-GGC GGC CAGGGC TCC GAC - 3'            | COL-1<br>3'-AAT TCC TGG TCT GGG GCA CC- 5'       | 18/20               | 347                 | 61° C                       |
| MMP-1<br>5'-GGT GAT GAA GCA GCC CAG - 3'           | MMP-1<br>3'-CAG TAGAAT GGG AGA TAC 5'            | 18/18               | 437                 | 53° C                       |
| TIMP-1<br>5'- AGT CAA CCA GAC CAC CTT ATA CCA - 3' | TIMP-1<br>3'- TTT CAGAGCCTT GGA GGA GCT GGT C 5' | 24/25               | 386                 | 60° C                       |
| GAPDH<br>5'- ATT CCA TGG CAC CGT CAA GGC T - 3'    | GAPDH<br>3'- TCA GGT CCA CTG ACA CGT T 5'        | 22/22               | 571                 | 62° C                       |

Las muestras se posicionaron en el termociclador de acuerdo a la temperatura de alineamiento del cada par de primers durante 27 ciclos. Las amplificaciones fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidas con bromuro de etidio.

## 9.14 HISTOLOGÍA

### 9.14.1 Procesamiento histológico de la encía

Con la finalidad de distinguir fibroblastos, matriz extracelular y células de infiltrado inflamatorio, cada muestra de encía fue colocada en paraformaldehído al 4%, marcada con tinta china, cortada con un microtomo y teñida con H&E y Masson.

Para comenzar, las muestras se colocaron con el epitelio hacia abajo y con tinta china se tiñeron las bases durante 1 minuto. Después durante 30 segundos se sumergieron en solución de Bouin's, la cual se compone de 750ml de ácido pícrico saturado, 250ml de formol al 40% y 50ml de ácido glacial acético.

Posteriormente se retiraron de la solución procediendo a seccionarlas con ayuda de un bisturí de hoja 15 en pedazos más pequeños para meterlas en cassetes para inclusión (Tissue processing leembedding cassette, Simport), una vez dentro sumergimos los cassetes en formalina amortiguada al 10%.

Después, los cassetes con las muestras se metieron a un tren de deshidratación durante toda la noche y al día siguiente las muestras se embebieron en parafina. Para ello se calentó la parafina (Para plast tissue embedding médium, McCormick) y se colocaron las muestras en cajas metálicas sobre un plancha caliente vaciando la parafina caliente sobre ellas. Inmediatamente después, las cajas metálicas se llevaron al hielo para poder orientar las muestras. Una vez posicionadas las muestras se metieron al congelador durante 5 minutos.

Los bloques de parafina fueron separados de las cajas metálicas emparejándolas a 25 micras, es decir se realizaron cortes quitando la parafina excedente hasta llegar al tejido, y se llevaron al congelador durante 10 minutos.

Posteriormente, los bloques se cortaron a 15 micras y se fueron sacando tiras de los cortes, las cuales se colocaron en una tina con agua con una temperatura entre 38 y 44 °C. Con laminillas se tomaron los cortes y se llevaron a una plancha caliente de 5 a 10 minutos para que el corte se fijara a la laminilla.

### 9.14.2 Desparafinación

Antes de comenzar con las tinciones se lleva a cabo el proceso de desparafinación dentro del mismo tren de tinción, estos pasos incluyen pasar las laminillas haciendo baños rápidos por dos xiloles, 1 en parte igual de alcohol y xilol, dos alcoholes de 100 o absolutos, dos alcoholes del 96 y agua destilada.

### 9.14.3 Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)

Para realizar la tinción de las muestras se desparafinaron e hidrataron hasta llegar a agua destilada pasando por xilol y alcohol a diferentes concentraciones, dejando las laminillas de 3 a 5 segundos, como se explicó anteriormente. Después se pasaron al recipiente que contiene Hematoxilina de Gills y se dejaron de 3 a 5 minutos.

Inmediatamente después, se lavaron con agua corriente durante 5 minutos y se hicieron enjuagues rápidos en solución de Scott la cual contiene un litro de agua corriente, 16 gramos de sulfato de magnesio y dos gramos de bicarbonato de sodio, durante un minuto. Luego se volvió a lavar en agua corriente durante 5 minutos y se pasó al recipiente que contiene Eosina y se dejó 1 minuto.

Por último se pasó a deshidratar y aclarar pasando por distintas concentraciones de xilol y alcohol dando baños rápidos de 3 a 5 segundos. Al finalizar se montó un portaobjetos con ayuda de una resina y se dejó secar (Figura 11).

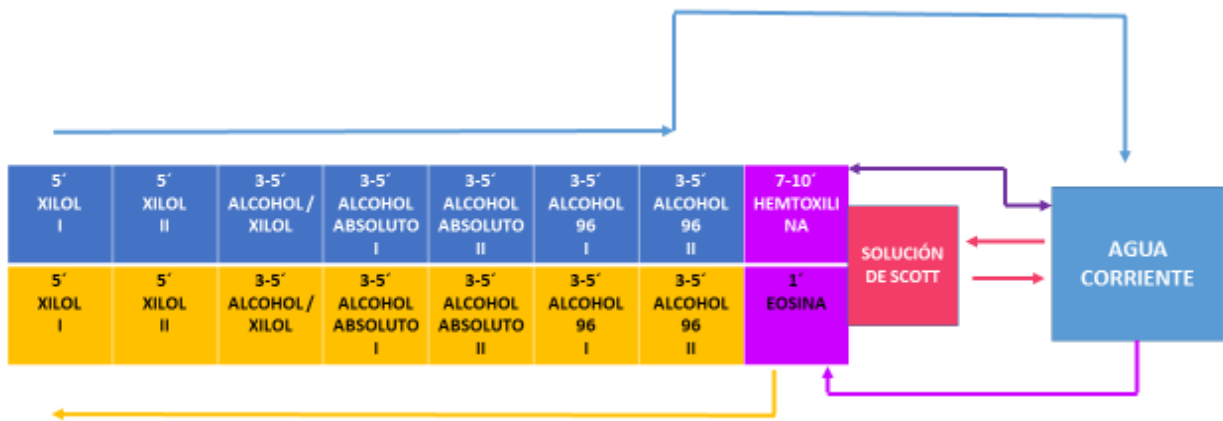


Figura 11. Tren de tinción de Hematoxilina y Eosina.

#### 9.14.4 Tinción de Masson

Es una técnica para la coloración de fibras de colágena, en la que se observan tres colores distintos, fibras de colágena maduras azul, tejido muscular verde pardo, eritrocitos color rojo, núcleos azul oscuro y citoplasma y fibras musculares rosas.

Para su realización se comenzó con un desparafinado, colocando las muestras sobre una estufa durante 30 min. a 60°. Después se sumergen las muestras en xilol durante 10 o 15 min.

Posteriormente se procedió con la hidratación pasando por alcohol absoluto por 5 minutos, luego alcohol al 96 durante 5 minutos y por último por alcohol al 70 por 5 minutos.

Luego se lavaron en agua destilada y se pasaron a Hematoxilina de Weigert por 5 min. Después se lavaron con agua corriente durante 10 min. Posteriormente se colocaron en las siguientes soluciones dejando las laminillas 5 minutos en cada solución: Fucsina de Ponceau, ácido fosfomolibdico, ácido fosfomolibdico y verde luz.



Por último se deshidrataron con baños rápidos en alcohol del 70, alcohol del 96 y xilol. Para finalizar se realizó el montaje de las laminillas con ayuda de resina, y se dejó secar.

## 10.RESULTADOS

### 10.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

Se realizaron tres curvas de crecimiento del paciente sano en los pases cinco, seis y siete, y tres curvas de cada uno de los especímenes de células de pacientes que tomaban nifedipino en los pases tres, cuatro y cinco.

De los resultados obtenidos se realizó una curva promedio tanto del paciente sano así como los pacientes que tomaban nifedipino, de esta manera se pueden apreciar los resultados en la Figura 12.

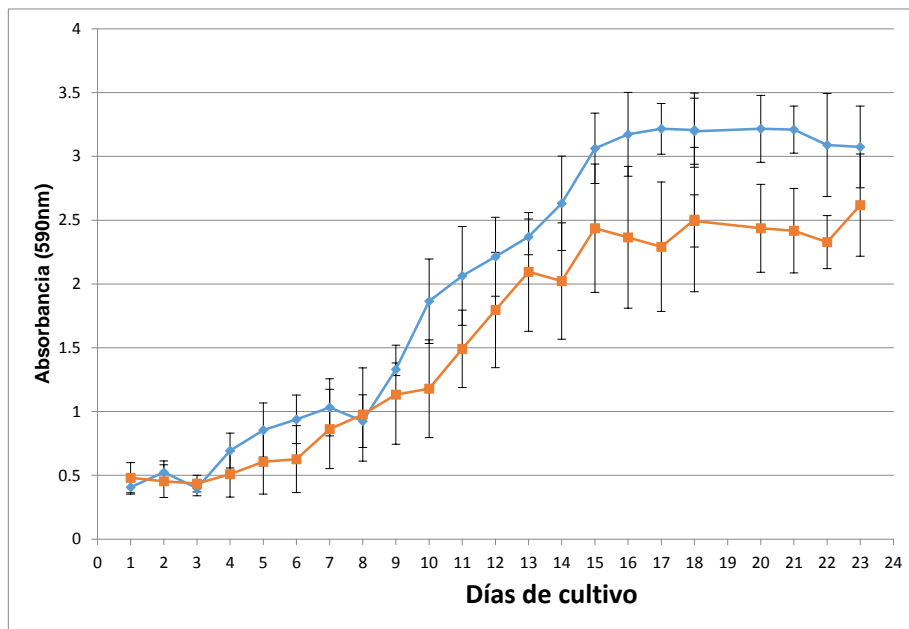


Figura 12. Curva de Crecimiento “Comparativo Nifedipino y Sano”. Se observan dos gráficas, en azul se encuentra células sanas y en naranja células derivadas de pacientes que toman nifedipino, que corresponden al promedio de las tres curvas de crecimiento de cada línea celular.

Al apreciar la figura 12 se puede observar la comparación entre las células Sanas y nifedipino. El crecimiento de la línea celular de las células sanas es ligeramente más rápida que nifedipino, al igual que su punto máximo. Por otro lado, en las fotografías de las células de las curvas de crecimiento que se tomaron se puede observar lo siguiente:

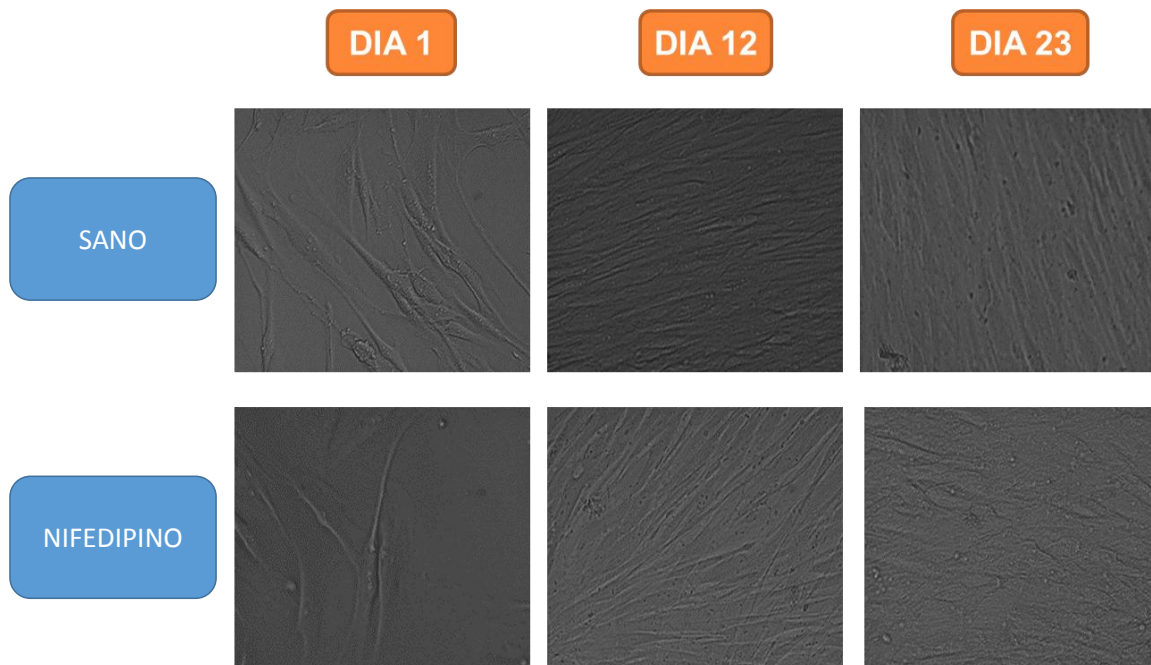


Figura 13. Cuadro comparativo de crecimiento celular de las células sanas y de las células derivadas de pacientes que tomaban nifedipino donde se tomaron fotografías de los días más representativos de las curvas de crecimiento.

Las células sanas crecen más rápido que las células de nifedipino, en la figura 13 se puede observar claramente como en el día doce hay mayor cantidad de células sanas que nifedipino y en el día 23, se aprecia saturado el pozo de las células y varias de ellas muertas.

## 10.2 CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Para la realización del experimento se tomó una muestra de las células sanas en pase siete y de nifedipino en pase cuatro, posteriormente se obtuvieron las concentraciones de los especímenes para correr el gel de agarosa. Previamente antes de llevar las muestras al gel de agarosa, en una porción de parafilm se colocó 2µl de buffer, lo correspondiente de agua y la concentración adecuada de la muestra, todo lo anterior se mezcló y se llevó al gel de agarosa.

| ESPECIMEN     | CONCENTRACIÓN | H <sub>2</sub> O | BUFFER | TOTAL |
|---------------|---------------|------------------|--------|-------|
| Sano_P7       | 5.9µl         | 2.1µl            | 2µl    | 10µl  |
| Nifedipino_P4 | 2µl           | 6µl              | 2µl    | 10µl  |

## 10.3 CICLO DEL RT-PCR



Figura 14. Resultado de RT-PCR a 20 ciclos. A corresponde a células sanas y B corresponde a nifedipino.

A 20 ciclos se observa claramente la expresión de colágena tipo 1 en el carril de nifedipino, pero no se aprecia su expresión de metaloproteasa, en cambio las células sanas si la presenta. Por otro lado TIMP no se observa en ninguna de las

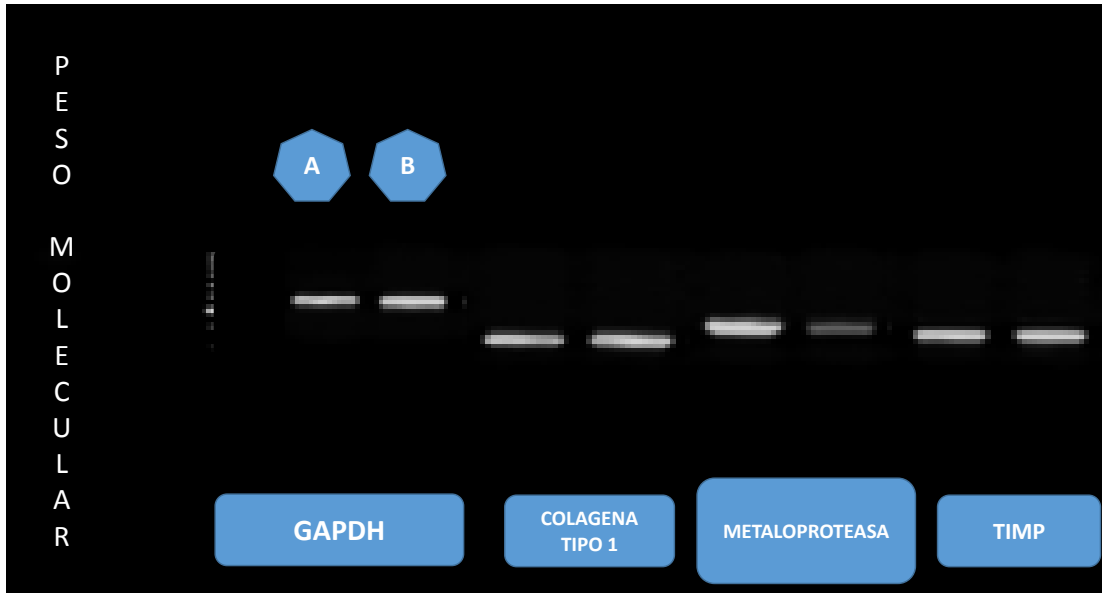


Figura 15. Resultado de RT-PCR a 30 ciclos. A corresponde a células sanas y B corresponde a nifedipino.

A 30 ciclo se aprecia colágena tipo I un tanto en las células sanas como en nifedipino, aunque en este último se observa más intenso. Por otro lado la metaloproteasa se observa claramente que son las células sanas quienes la expresa (Figura 15).

## 10.4 HISTOLOGÍA

Para realizar el estudio histológico, se tomaron fotografías de las muestras en H&E y Masson a 10x, 32x y 100x de la misma zona tanto de la muestra de paciente sano y nifedipino.

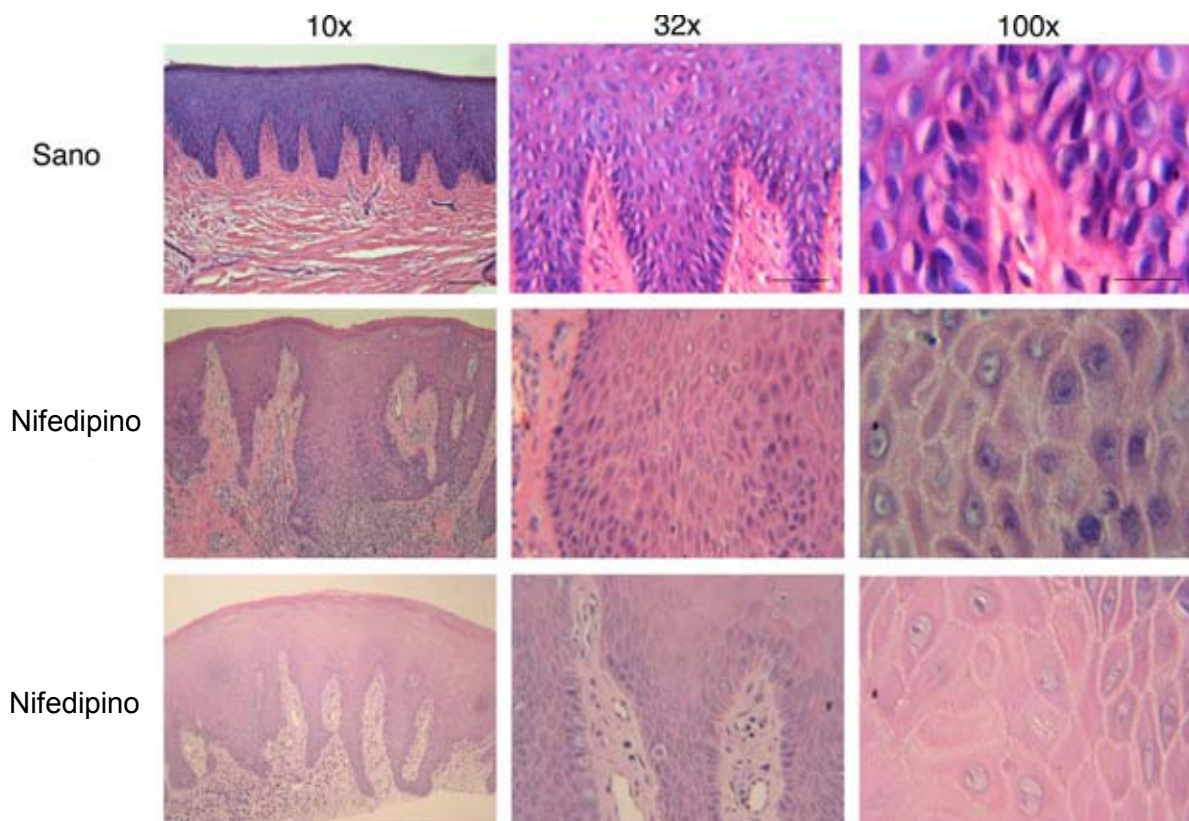


Figura 16. Cuadro comparativo del epitelio tinción de H & E. Fotografías histológicas donde se muestran imágenes correspondientes al paciente sano y a los individuos que tomaban nifedipino a tres aumentos y escalas diferentes, 10x (100 $\mu$ ), 32x (50 $\mu$ ) y 100x (20 $\mu$ ).

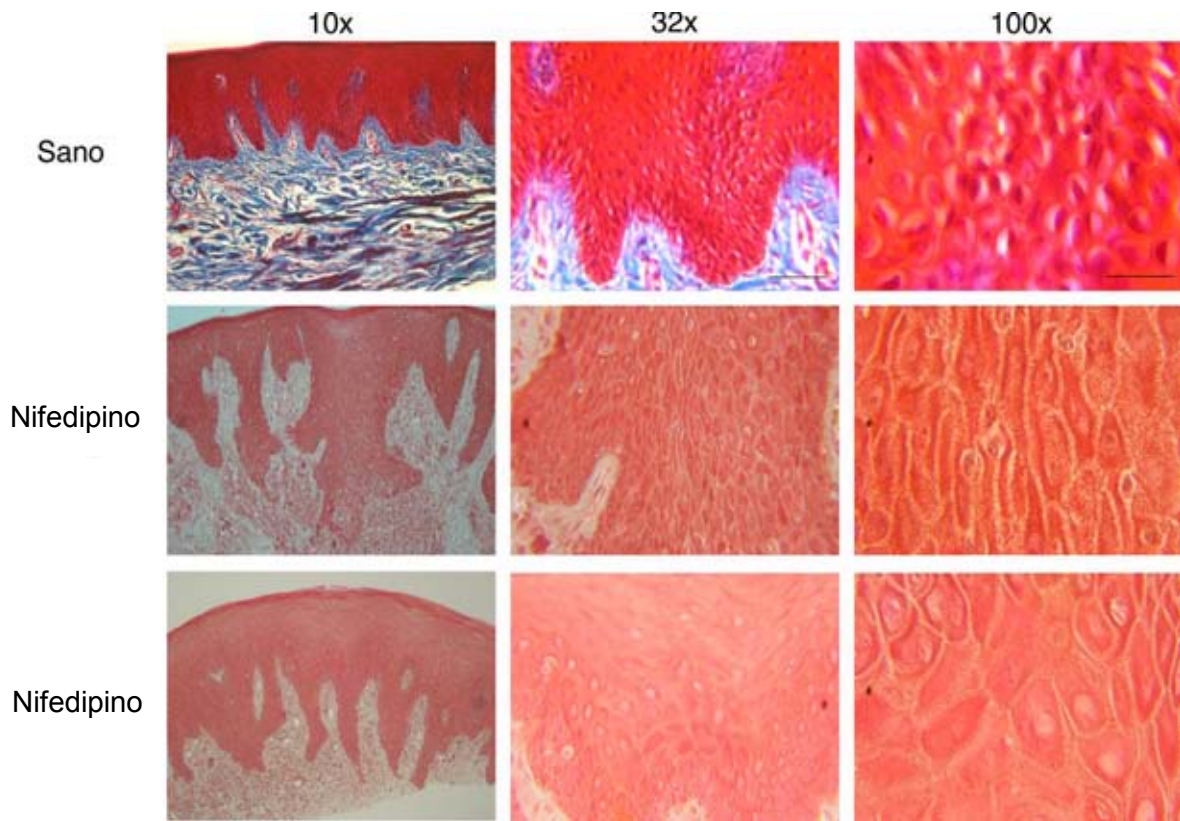


Figura 17. Cuadro comparativo del epitelio en tinción de Masson. Fotografías histológicas donde se muestran imágenes correspondientes al paciente sano y a los individuos que tomaban nifedipino a tres aumentos y escalas diferentes, 10x (100 $\mu$ ), 32x (50 $\mu$ ) y 100x (20 $\mu$ ).

El epitelio sano presenta como características una conservación bien delimitada de los clavos epiteliales, sin infiltrado linfocitario dentro de éste, y se muestra un estratificado claro de las células que lo componen.

Como se puede observar en la figura 16 y 17, la tinción de H&E y Masson de la muestra de nifedipino, a 10x se observan parches de infiltrado linfocitario y de células plasmáticas en el epitelio, por lo cual se puede denominar como una acantosis.

Por otro lado a 40x se aprecia una gran pérdida del estratificado típico de un epitelio, debido a la acantosis provocada por el infiltrado inflamatorio, por último a 100x solo se observa la presencia de las células escamosas.

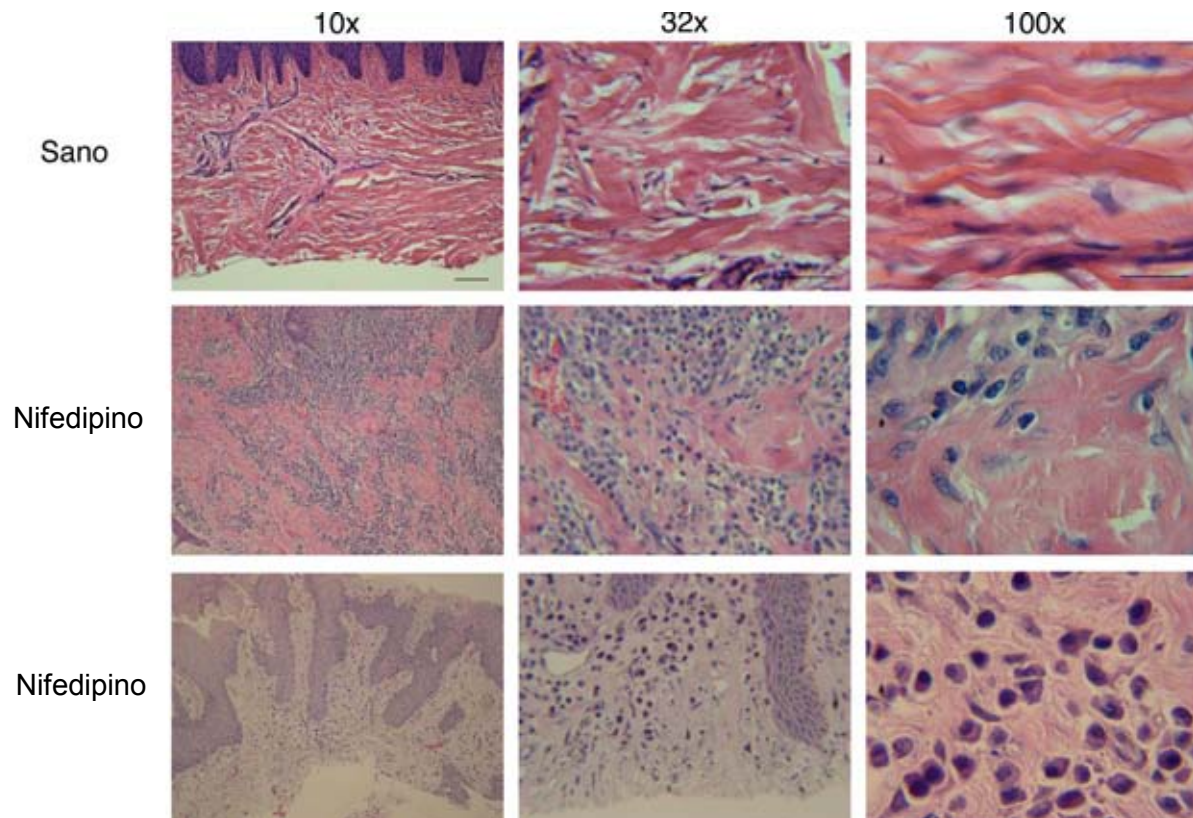


Figura 18. Cuadro comparativo del mesénquima en tinción de H & E. Fotografías histológicas donde se muestran imágenes correspondientes al paciente sano y a los individuos que tomaban nifedipino a tres aumentos y escalas diferentes, 10x (100 $\mu$ ), 32x (50 $\mu$ ) y 100x (20 $\mu$ ).

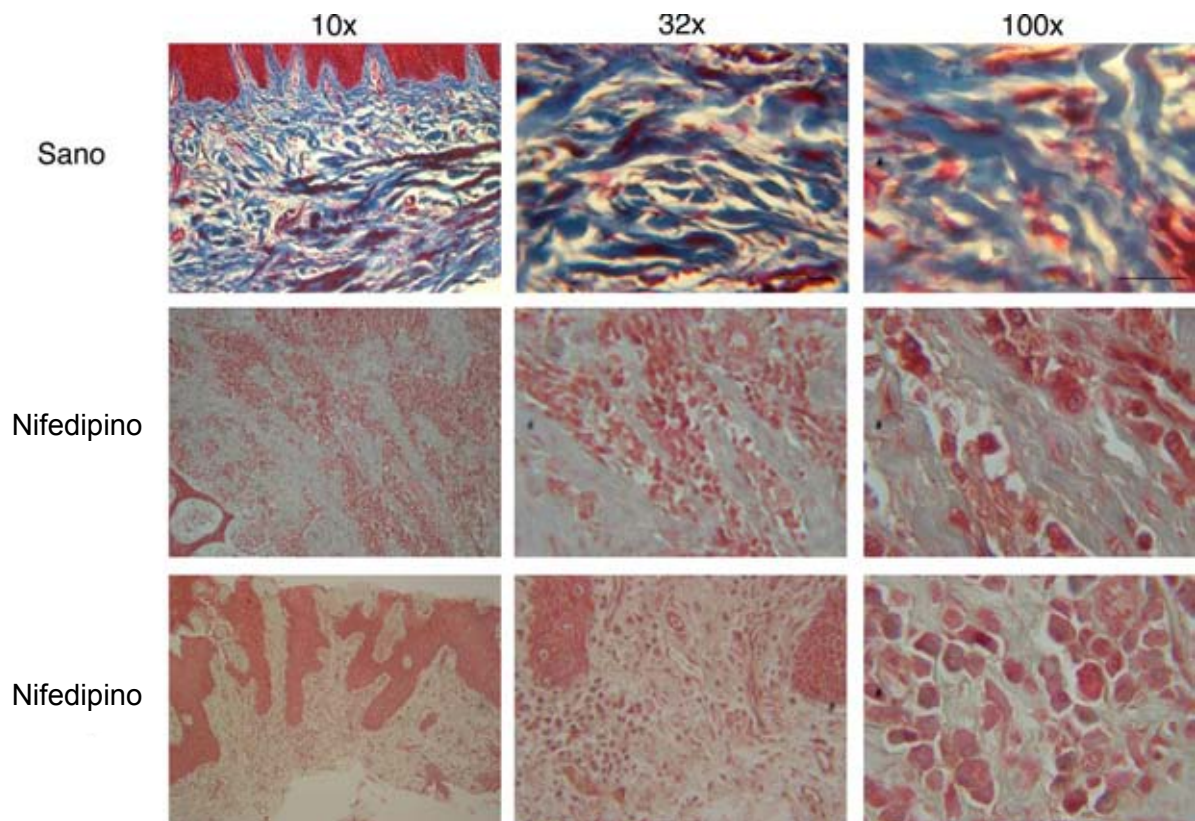


Figura 19. Cuadro comparativo del mesénquima en tinción de Masson. Fotografías histológicas donde se muestran imágenes correspondientes al paciente sano y a los individuos que tomaban nifedipino a tres aumentos y escalas diferentes, 10x (100 $\mu$ ), 32x (50 $\mu$ ) y 100x (20 $\mu$ ).

El mesénquima sano normalmente contiene muy poca cantidad de células inflamatorias y existe una disposición homogénea de fibras de colágena.

Por otro lado en las laminillas de nifedipino, a 10x en la tinción de H&E se observan haces de colágena densos dispuestos irregularmente, entrecruzados con parches de infiltrado inflamatorio de predominio de células plasmáticas y algunos linfocitos. A 10x en tinción de Masson se observan haces de colágena densos de color azul, lo cual nos indica la presencia de colágena madura (Figura 18 y 19).



A 40x en la tinción de H&E, se aprecian neoformaciones vasculares, algunos cuerpos de Rosell o droplets que son inmunoglobulinas y parches de infiltrado inflamatorio.

Por último, a 100x en ambas tinciones se observan los haces densos de colágena en azul en la tinción de Masson, dentro de los haces de colágena se aprecian de color rosado unas figuras de forma ahusada llamados fibroblastos (Figura 18 y 19).

## **11.DISCUSIÓN**

Los resultados de esta investigación demuestran que no existe una proliferación mayor de fibroblastos gingivales humanos de pacientes medicados con nifedipino comparado con la proliferación de fibroblastos gingivales de pacientes sanos, por lo que el agrandamiento no parece ser producto del aumento en la cantidad de células.

Por otro lado no existen estudios histológicos donde se demuestre que encuentren mayor cantidad de fibroblastos gingivales y aun así algunos estudios lo proponen <sup>11,14,17</sup>. Nosotros observamos una evidente infiltración linfocitaria y de células plasmáticas. Esta infiltración es el probable reflejo de una inflamación crónica.

En nuestra investigación podemos decir que existe una gran cantidad de colágena acumulada de acuerdo a los resultados obtenidos en la RT-PCR donde hay una mayor expresión de colágena tipo I y menor expresión de MMP-1, a diferencia de lo que menciona Sakagami donde menciona que no hay cambios sobre MMP-1. <sup>6</sup>.

## **12.CONCLUSIONES**

El crecimiento de los fibroblastos gingivales humanos de individuos sanos es mayor al de pacientes que toman nifedipino.

Los cortes de encía de pacientes que toman nifedipino poseen un infiltrado linfocitario.

La expresión de colágena tipo 1 es mayor en los fibroblastos gingivales humanos de pacientes que toman nifedipino que en individuos sanos.

La expresión de MMP-1 es menor en los fibroblastos gingivales humanos de pacientes que toman nifedipino que en individuos sanos.

El agrandamiento gingival inducido por nifedipino es provocado por la acumulación de colágena tipo 1 y su pobre degradación.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Lindhe J. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Tomo 1, 5ª ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana, 2009; 5-26.
2. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. 11<sup>th</sup> ed. St. Louis. Elsevier Saunders, 2012; 46-67, 919-67.
3. Junqueira LC. Histología básica. 6ª ed. España. Elsevier Masson, 2006; 67-91.
4. Geneser Finn. Histología. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana, 2007; 157-175.
5. Coronato S. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. Medicina (Buenos Aires). 2012; 72: 495-502.
6. Sakagami G. Effects of nifedipine and interleukin-1a on the expression of collagen matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human gingival fibroblast. Journal of Periodontal. 2006; 41: 266-72.
7. Mariotti. Dental plaque induced gingival diseases. Ann Periodontol; 1999.
8. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999; 41:1-6.
9. Seymour R. Oral and dental adverse drug reactions. Periodontology 2000. 2008; 46: 9-26.
10. Sousa P. Clinical Assessment of nifedipine induced gingival overgrowth in a group of Brazilian patients. ISRN Dentistry. 2008; 2011: 1-5.
11. CADIME. Hiperplasia gingival por medicamentos. SEMERGEN; 2007.
12. Miranda J. Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with nifedipine. Journal Periodontol. 2001; 72: 605-611.
13. Ellis JS, Seymour RA, Steele JG, Robertson P, Butler TJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. J Periodontol. 1999;70:63-67.

14. Ruíz JE. Hiperplasia gingival inducida por nifedipino. Nefrología. 1995;15:391-394.
15. <http://www.quimicaorganica.org/sintesis-organica/663-sintesis-de-la-piridina-y-sus-derivados.html>
16. Goodman, Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. Mc Graw Hill, 2006; 857-858.
17. Pihlstrom B. Evaluación del riesgo periodontal, diagnóstico y planificación del tratamiento. Periodontology 2000. 2002;1:37-58.
18. Nakib N. Drug induced gingival overgrowth. Dismon. 2011;57:225-30.
19. Ciancio S. Medication a risk factor for periodontal disease diagnosis and treatment. Journal Periodontol. 2005;76:2061-5.
20. <http://ensanut.insp.mx/>. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.
21. [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript\\_onestepRTPCR\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscript_onestepRTPCR_man.pdf)